



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia  
Universidade Técnica de Lisboa**



**Análise dos alelos S das cerejeiras ‘De Saco do Douro’ e  
‘De Saco da Cova da Beira’. Estabelecimento de um  
método para a avaliação da polinização e vingamento em  
condições de campo**

**Francisco Maria Beirão Pinto de Castelo Branco**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Agronómica**

Orientador: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Co-orientador: Prof. Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira

**Júri:**

Presidente: Doutor Ernesto José de Melo Pestana Vasconcelos, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutor Alberto da Silva Álvares dos Santos, Professor Associado da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro;

Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Teresa Moreira Valdivieso Spínola, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.;

Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Investigadora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2010

---

## Agradecimentos

Queria agradecer ao Eng. Filipe Costa da Cerfundão pela ajuda na recolha de folhas da cultivar De Saco da Cova da Beira.

Ao Engenheiro Rui de Sousa do Centro de Actividades da Fruticultura do INRB (ex-ENFVN), pela cedência de folhas da cultivar De Saco do Douro da colecção, e dos sacos de algodão utilizados nos ensaios de polinização controlada, bem como por nos ter ensinado a fazer a emasculação e polinização das flores.

Ao Professor Doutor Alberto Santos pelo apoio prestado tanto a nível pedagógico como a nível logístico através da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), que nos proporcionou as condições necessárias para a realização dum trabalho rigoroso, nomeadamente condições de temperatura estabilizada e existência de microscópio óptico para uma melhor visualização e contagem dos grãos de pólen.

Queria agradecer também ao professor Valdemar Carnide pela disponibilidade e o apoio que me deu no laboratório da UTAD.

À Professora Cristina Oliveira pela sua amabilidade e apoio prestados ao longo de todo o trabalho.

Queria também agradecer ao Sr. Armando Rodrigues da Quinta de Cantim e ao Sr. Rogério da Silva da Quinta de Vila Verde por todo o apoio que me deram nos ensaios de campo e pelas árvores 'De Saco do Douro' que me cederam para a realização do ensaio, sem esta preciosa ajuda o ensaio não se teria realizado.

Por último queria agradecer a Deus por todas as pessoas que pôs no meu caminho, pelos dias passados no campo e pelos momentos que estive no laboratório, pelas pessoas que conheci ao longo deste trabalho, pela minha Família que me tem apoiado incondicionalmente e de modo muito especial pela Doutora Mariana que tem sido incansável no apoio que me deu ao longo de todo o trabalho. Obrigado por tudo.

---

## Resumo

Neste estudo o conteúdo em alelos S de incompatibilidade de duas cultivares portuguesas de cerejeira com elevado interesse devido às características do seu fruto, a 'De Saco da Cova da Beira' e 'De Saco do Douro', foi analisado por processos moleculares a partir de DNA genómico de cada cultivar, utilizando iniciadores específicos na amplificação das sequências codificadoras dos alelos S. Na 'De Saco da Cova da Beira' foram identificados os alelos  $S_3$  e  $S_5$ , identificando-se na 'De Saco do Douro' apenas o  $S_9$ . Paralelamente, estabeleceu-se um método expedito e objectivo para avaliar o vingamento das cerejeiras em condições de campo, incidindo o trabalho experimental sobre a cultivar De Saco do Douro. Procedeu-se à polinização controlada desta cultivar com pólen proveniente das cultivares Bing, Van, Burlat e da própria De Saco do Douro. A viabilidade e o potencial de germinação do pólen das polinizadoras foram avaliados com três corantes (IKI, TTC e X-Gal), e através da análise de germinação. Todos os processos revelaram baixas percentagens de viabilidade do pólen, provavelmente devido à sua imaturidade, que poderá ter resultado das baixas temperaturas ocorridas em Abril. A percentagem de vingamentos obtidos foi baixa, em concordância com os testes efectuados à qualidade do pólen.

**Palavras-chaves:** incompatibilidade gametofítica, S-RNase, *Prunus avium*, polinizadoras, viabilidade do pólen

---

## Abstract

In this study, the content in incompatibility S-alleles from two Portuguese cherry cultivars with great interest due to their fruit characteristics, the 'De Saco da Cova da Beira' and 'De Saco do Douro', was analyzed by molecular processes, using specific primers to amplify the sequences encoding S-alleles from the genomic DNA of each cultivar. For the cultivar 'De Saco da Cova da Beira' the alleles  $S_3$  and  $S_5$  were identified, whereas for the cultivar 'De Saco do Douro' it was only possible to identify the allele  $S_9$ . An expeditious and objective method to assess the fruit set of sweet cherry trees in field conditions was also established. In this procedure, controlled pollinations of the cultivar 'De Saco do Douro' were made, using pollen from four pollinator cultivars, Bing, Van, Burlat and 'De Saco do Douro' itself. The viability and germination potential of the pollen were assessed by three processes involving their staining (IKI, TTC and X-Gal) and one process involving their germination. All processes revealed low percentages of pollen viability, probably due to the low temperatures occurred in April, which might have delayed the maturation of pollen grains. In agreement the fruit set percentage obtained was low.

**Key-words:** gametophytic incompatibility, S-RNase, *Prunus avium*, pollinators, pollen viability

---

## Expanded Abstract

Sweet cherry cultivars De Saco da Cova da Beira and De Saco do Douro are traditional cultivars with great interest due to their fruit characteristics. The first one has a significant economic importance in Portugal, mainly in northeast region, due to the sweetness of the fruit, which is particularly suitable for jam. The 'De Saco do Douro' has also very good properties, but until the present, has been very less studied.

This work aimed to identify the S alleles responsible for GSI (gametophytic self incompatibility system) of these two cultivars, and to establish a suitable method to assess fruit set under field conditions. This research derived from the hypothesis that both GSI and the absence of good and compatible pollinator cultivars are the reasons for the reduced fruit set that is observed in these two traditional Portuguese sweet cherry cultivars. The identification of the S-alleles, enabling the selection of good pollinator varieties, and the evaluation of the conditions for insect pollination and fertilization, will support technical decisions that contribute for the obtention of good fruit sets and consequently good yields.

A quick and objective method was established to evaluate, under field conditions, the pollen viability of four pollinator cultivars locally interesting (Burlat, Bing, Van and De Saco do Douro) and the fruit set of the sweet cherry cultivar De Saco do Douro after controlled pollination with these cultivars.

The viability and the potential of germination of the pollens to be used were assessed by different *in vitro* methods in order to test their effectiveness and applicability under field conditions. Three processes involving the staining of pollen grains, and another process involving the germination of pollen grains in agar-plate with 15% of sucrose were tested. All procedures were tested with fresh pollen and with sterilized pollen (incubation at 80 °C for two hours) from each of the pollinators. The three stains IKI (potassium iodide), TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) and X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) were tested with the four different pollens. In IKI test, both fresh and sterilized pollen were stained by IKI suggesting that this test is not very precise. The X-Gal test was also inconclusive, because stained and non-stained pollen grains were not distinguishable. The TTC test was the one with most solid results. In this test, the percentage of stained pollen grains was low and ranged enormously among the four cultivars, varying from around 5 % in 'Bing' and 'Burlat' until near 50 % in 'De Saco do Douro', revealing once more the lack of homogeneity in pollen viability, most probably due to imbalances in the process of maturation, caused by climatic factors.

The germination tests revealed very low germination rates, with values close to each others, nevertheless, pollinator 'Van' had the highest pollen germination percentage, whereas 'Bing' had the lowest germination rate, reflected in the absence of fruit set in this cultivar. With the

---

sterilized pollen no germinated grains were observed. This method is more accurate because the viability is directly measured observing if the pollen grain is germinated or not. According to literature already published, the germination percentages of cherry pollen ranged between 52 – 66 %, rather superior of those obtained in the present work. A possible explanation for these low values of pollen viability may consist in the immaturity of pollen collected from pollinator cultivars, due to the low temperatures observed in April, that might have delayed the maturation of pollen grains reducing its viability.

Fruit set was assessed after controlled crossings made between the 'De Saco do Douro' and the cultivars Van, Bing, Burlat and 'De Saco do Douro' itself, in order to simulate a self-pollination. The results showed that the highest number of fruit sets on 'De Saco' (25 %) was obtained with the pollinator 'Burlat', whereas with the pollinator 'Bing' there was no fruit set. The crossing that represents the self-pollination showed almost 13 % of fruit set, higher than the crossing with the pollinator 'Van', which only resulted in 8 % of fruit set. In general, these results were rather low compared with other studies already published. Besides the genetic factor, that may determine higher or lower compatibility, fruit set is also determined by climatic factors, such as temperature and precipitation, which influences physiology of pollen grains and pistils. In fact, the germination of pollen grains, the growth velocity of the pollen tube and also the longevity of the ovule viability are strongly affected by temperature, and during this field assay the climate conditions were quite adverse (low temperature, rain and some wind) which might had contributed to these results.

The identification of the incompatibility S-alleles in 'De Saco da Cova da Beira' and 'De Saco do Douro' was made applying methodologies already established to other sweet cherry cultivars. Molecular methods were used to determine the S-alleles content, because they are more rigorous and faster than other processes (like controlled pollinations). Additionally, just a small quantity of leaf material (or other plant tissue) is required, allowing to obtain quick results in any time of the year. Genomic DNA was extracted from young leaves and the amplification of the partial sequences of the S-alleles was made by PCR using specific primers pairs (PaConsl and PaConsII). The amplified fragments were cloned and sequenced, being the content in S-alleles deduced by homology with sequences already stored in GenBank. Using these two primer pairs, two S-alleles were identified in the cultivar De Saco da Cova da Beira, S<sub>3</sub> and S<sub>5</sub> and only one S-allele was identified in 'De Saco do Douro', S<sub>9</sub>. Enzymatic digestions with the restrictions enzymes Mbol and SacI, and PCR amplifications with a new pair of primers (Pru-T2 & SI-32) were carried out to identify the second allele of this cultivar, but these strategies were not successful during the period of this work. The knowledge of the S-alleles of both cherry cultivars 'De Saco' represents a great benefit for growers of these Portuguese cultivars, allowing them to choose genetically compatible pollinators, extremely important aspect to obtain a good productive potential.

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Expanded Abstract.....	iv
Índice.....	vi
Lista de quadros.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Lista de abreviaturas.....	ix
1. Introdução .....	1
2. Revisão bibliográfica.....	3
2.1. Importância económica da cultura da cerejeira em Portugal e no Mundo.....	3
2.2. As cultivares de cerejeira 'De Saco'.....	3
2.3. Polinização e vingamento em cerejeira.....	5
2.4. Incompatibilidade em Rosáceas.....	7
2.4.1. Sistema de incompatibilidade gametofítica (GSI).....	7
2.4.2. Estrutura e localização do gene que codifica a S-RNase.....	9
2.4.3. Estudos moleculares em GSI.....	10
2.4.4. Implicações na cultura das cerejeiras 'De Saco'.....	12
3. Materiais e métodos.....	14
3.1. Ensaio para a determinação do vingamento na cultivar De Saco do Douro e avaliação da viabilidade do pólen das cultivares Burlat, Bing, Van e De Saco do Douro.....	14
3.1.1. Ensaio para a determinação do vingamento.....	14
3.1.2. Ensaio para testar a viabilidade e o potencial de germinação do pólen.....	16
3.2. Ensaio para a identificação dos alelos S das cultivares De Saco da Cova da Beira e De Saco do Douro .....	17
3.2.1. Origem e preparação do material vegetal.....	17
3.2.2. Identificação das sequências genéticas parciais de alelos S de cerejeiras.....	18
4. Resultados.....	22
5. Discussão.....	32
6. Conclusões.....	44
Referências bibliográficas.....	47
ANEXOS.....	51

---

## Lista de Quadros

Página

Quadro I – Sequências nucleotídicas dos iniciadores utilizados na reacção de PCR para a amplificação do primeiro e segundo intrão das S-RNases de cerejeira.....	19
Quadro II – Taxa de germinação do pólen viável das quatro cultivares polinizadoras.....	22
Quadro III – Contagem do número de grãos de pólen corados e não corados das quatro cultivares polinizadoras para cada teste de coloração, para o pólen fresco.....	23
Quadro IV – Contagem do número de grãos de pólen corados e não corados das quatro cultivares polinizadoras para cada teste de coloração, para o pólen estéril.....	23
Quadro V – Taxa de vingamentos obtidos na cultivar De Saco do Douro após uma polinização controlada com o pólen das cultivares polinizadoras.....	25
Quadro VI – Peso molecular aproximado dos fragmentos resultantes da amplificação por PCR, do DNA genómico dos oito genótipos utilizados no ensaio para a avaliação do vingamento, do genótipo AL e do genótipo CB utilizando, o par de iniciadores PaConsl.....	27
Quadro VII – Alelos identificados por homologia das sequências obtidas por sequenciação dos vários genótipos, com sequências já existentes no GenBank.....	29
Quadro VIII – Homologia dos fragmentos amplificados com o par de iniciadores PaConsl com sequências já armazenadas em base de dados.....	30
Quadro IX – Homologia dos fragmentos amplificados com o par de iniciadores PaConslII com sequências já armazenadas em base de dados.....	30
Quadro X – Alelos de incompatibilidade gametofítica das cultivares polinizadoras e das duas cultivares ‘De Saco’.....	31



---

## Lista de Figuras

Página

Figura 1 - Descrição esquemática da germinação do pólen no estigma e inibição do crescimento, ao nível do estilete, do tubo polínico do grão de pólen que possui o alelo comum ao pistilo, resultando nas três formas possíveis: (A) Incompatibilidade gametofítica; (B) Semi-incompatibilidade gametofítica e (C) Compatibilidade gametofítica.....	8
Figura 2 - Estrutura da S-RNase de um <i>Prunus</i> , com a localização dos intrões e a posição dos iniciadores.....	19
Figura 3 - Grãos de pólen da cultivar polinizadora Burlat germinados em placas de gel de agar e sacarose.....	22
Figura 4 - Grãos de pólen corados pelo teste do IKI (assinalados a encarnado) e não corados (assinalados a azul). a) Pólen fresco da cultivar Van. b) Pólen estéril da cultivar Van.....	24
Figura 5 - Grãos de pólen corados pelo teste do TTC (assinalados a encarnado) e não corados (assinalados a azul). a) Pólen fresco da cultivar De Saco do Douro. b) Pólen estéril da cultivar Van.....	24
Figura 6 - Coloração dos grãos de pólen depois de submetidos ao teste do X-Gal. a) Pólen fresco da cultivar De Saco do Douro. b) Pólen estéril da cultivar De Saco do Douro.....	25
Figura 7 - Frutinhas vingados resultantes da polinização da cultivar De Saco do Douro com o pólen da própria cultivar.....	26
Figura 8 - Análise dos produtos de PCR obtidos por amplificação do DNA genómico dos oito genótipos utilizados no ensaio para a avaliação do vingamento, do genótipo AL e do genótipo CB, utilizando o par de iniciadores PaConsl. Os produtos de PCR foram visualizados num gel de 2% de agarose e corados com brometo de etídio. O marcador 100 bp Ladder foi usado como standard de DNA (M).....	26
Figura 9 - Análise dos produtos de PCR obtidos por amplificação do DNA genómico dos oito genótipos utilizados no ensaio para a avaliação do vingamento, do genótipo AL e do genótipo CB, utilizando o par de iniciadores PaConsl. Os produtos de PCR foram visualizados num gel de 2% de agarose e corados com brometo de etídio. O marcador $\Lambda$ DNA HindIII/EcoRI foi usado como standard de DNA (M).....	27
Figura 10 - Análise dos produtos de PCR obtidos por amplificação do DNA plasmídico, utilizando iniciadores específicos do vector pCR®II (T7 & M13). Os produtos de PCR foram visualizados num gel de 2% de agarose e corados com brometo de etídio. O marcador 100 bp Ladder foi usado como standard de DNA (M).....	28

---

## Lista de abreviaturas

bp	Pares de bases
CI	Clorofórmio e álcool isoamílico 24:1
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide (brometo de hexadeciltrimetilamónio)
DMF	Dimetil formamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
dH <sub>2</sub> O	Água destilada esterilizada
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ENFVN	Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade
GSI	Gametophytic self incompatibility (auto-incompatibilidade gametofítica)
Kb	Kilo bases
IKI	Iodeto de potássio
LB	Meio Luria-Bertani
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacção da polimerase em cadeia)
pH	Índice que exprime a concentração do ião hidrogénio numa solução
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio)
TAE	Tris acetato EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris EDTA
TTC	2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio
UE	União Europeia
UV	Ultra Violeta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido
β-ME	2-mercaptoetanol

## 1. Introdução

Este trabalho foi realizado com o intuito de identificar os alelos S envolvidos no mecanismo de auto-incompatibilidade gametofítica nas cultivares de cerejeira ‘De Saco da Cova da Beira’ e ‘De Saco do Douro’, e também de estabelecer um método de avaliação do seu vingamento em condições de campo. Ambos os objectivos surgiram da necessidade de verificar se o sistema de incompatibilidade gametofítica e se a ausência de boas cultivares polinizadoras compatíveis, são razões para o fraco vingamento que se observa nestas duas cultivares.

A escolha das cerejeiras ‘De Saco’ como objecto de estudo prende-se com a sua importância económica em Portugal, sobretudo na região da Cova da Beira, devido à elevada qualidade que o seu fruto apresenta em termos de doçura e firmeza da polpa.

A identificação dos alelos S das cerejeiras ‘De Saco’, permitirá conhecer, através da comparação com os alelos de outras cultivares de cerejeira, quais as cultivares que são compatíveis com as ‘De Saco’, sendo este conhecimento de extrema importância para os produtores que, desta forma podem instalar novos pomares incluindo já as melhores árvores polinizadoras. A polinização e o vingamento são dois processos extremamente importantes em fruticultura, e que influenciam fortemente a produção de frutos, que é o objectivo desta actividade. Por isso, a escolha de boas variedades polinizadoras revela-se de grande interesse para que ocorra uma boa polinização, sendo a transferência de pólen num adequado estado de maturação por acção dos insectos a melhor forma de obter bons vingamentos e consequentemente gerar boas produções.

O trabalho experimental desenvolvido apresenta duas partes distintas. Na primeira parte, tentou estabelecer-se uma metodologia expedita e objectiva para acompanhar e avaliar, em condições de campo, o vingamento dos frutos da cultivar de cerejeira ‘De Saco do Douro’. A viabilidade e potencial de germinação dos pólenes a utilizar nos ensaios de polinização controlada foram avaliados por diferentes métodos *in vitro* recorrendo a testes de coloração e germinação em placa para determinar a sua eficácia e aplicabilidade em condições de campo. Como a identificação dos alelos S de incompatibilidade contribui para a obtenção de bons vingamentos mas não é suficiente, pois outros factores interferem com este processo, o estabelecimento de uma metodologia objectiva na avaliação do vingamento é muito importante para determinar quais os factores que podem resultar no sucesso ou insucesso da cultura.

Na segunda parte deste trabalho, procedeu-se à identificação dos alelos de incompatibilidade das cerejeiras ‘De Saco’, aplicando metodologias já estabelecidas para outras cultivares de cerejeira. A identificação dos alelos S foi efectuada através de métodos

moleculares, por estes serem os mais expeditos e necessitarem apenas de uma pequena quantidade de material vegetal, não tendo que ser necessariamente flores ou frutos, permitindo por isso obter resultados rápidos e em qualquer época do ano. Para a determinação das sequências parciais de DNA das formas do gene que codifica a proteína responsável pela rejeição do próprio pólen nas cerejeiras 'De Saco', foram realizadas extracções de DNA a partir de folhas jovens das cerejeiras 'De Saco da Cova da Beira' e 'De Saco do Douro', efectuou-se a amplificação por PCR das sequências parciais dos alelos S utilizando iniciadores específicos e procedeu-se à sua clonagem e sequenciação.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Importância económica da cultura da cerejeira em Portugal e no Mundo**

A produção mundial de cerejas foi estimada em 2008 em cerca de 1 802 231 ton, distribuída por uma área de aproximadamente 350 157 ha. Embora a cereja não seja dos frutos mais produzidos no mundo, a sua produção tem vindo a ganhar importância, reflectindo-se num aumento da área plantada desta cultura nos últimos anos. Em 2008 os cinco países com maior produção de cerejas a nível mundial foram: Turquia (18,8 %), EUA (12,5), Irão (11 %), Itália (7,5 %) e Ucrânia (4,1 %) (FAOSTAT) (Anexo I).

A representatividade da UE (27) na produção mundial de cerejas é de cerca de 27,2 %, correspondendo a cerca de 35,7 % da área mundial ocupada por esta cultura. Em 2008 os cinco maiores países produtores da UE (27) foram: Itália, Roménia, Espanha, Grécia, Polónia (FAOSTAT) (Anexo I).

Portugal é o 23º maior produtor de cerejas do mundo e o 10º maior da UE (27), tendo apresentado em 2008 uma produção de 10 528 t distribuídas por cerca de 6 255 ha, sendo esta área a 18ª maior do mundo. Esta discrepância entre a produção de cerejas e a área de cultivo correspondente deveu-se à baixa produtividade da produção nacional, que se fixou em 1,68 t/ha em 2008, tendo sido a segunda produtividade mais baixa dos 30 maiores países produtores de cereja do mundo (FAOSTAT) (Anexo I).

Em relação ao comércio internacional, a cereja é um produto cuja balança comercial é altamente deficitária, pois o valor das vendas ao exterior é muito inferior ao da compra. A Espanha é o maior fornecedor de cerejas a Portugal, e também o país que, a par de Angola e Cabo Verde, é o principal cliente da cereja nacional (Anónimo, 2007).

As cultivares mais comuns em Portugal são as seguintes: 'De Saco da Cova da Beira', 'De Saco do Douro', 'Lisboeta', 'São Julião', 'Big. Burlat', 'Marting', 'Napoleão Pé Comprido' e 'Big. Windsor' (Roxa), em que as primeiras quatro são de origem portuguesa. Nos últimos anos têm sido introduzidas cultivares que apresentam maior calibre e poder de conservação, sendo mais atractivas do ponto de vista comercial, como por exemplo: 'Brooks', 'Hedelfinger', 'Summit', 'Van', 'Bing', 'Earlise', 'Sunburst', 'Sweetheart' e 'Lapins', sendo as três últimas cultivares auto-compatíveis (Anónimo, 2007).

### **2.2. As cultivares de cerejeira 'De Saco'**

'De Saco da Cova da Beira' e 'De Saco do Douro' são duas cultivares regionais e tradicionais portuguesas de cerejeira muito representativas em Portugal. A 'De Saco da Cova da Beira' é mesmo uma das cultivares com maior importância económica na região da

Cova da Beira, onde chega a representar cerca de 40% de todas as variedades cultivadas na região (Costa, Comunicação pessoal).

Ambas as cultivares de cerejeira são referidas como tendo um fruto de grande qualidade, muito doce e carnudo, ideal para fazer compotas e muito procurado pela indústria da confeitaria. São frutos que apresentam uma polpa de elevada firmeza, sendo daí aliás que provem o curioso nome destas cultivares: por causa da sua dureza e natural resistência ao transporte, a cereja podia ser transportada de saco.

Embora bem adaptadas a solos muito variados, as cerejeiras são relativamente susceptíveis à asfixia, não só pela falta de ar ao nível das raízes provocado, por exemplo, pelo excesso de água, mas também pela maior susceptibilidade no aparecimento de parasitas, que originam cancro no colo e podridões radiculares (Durán, 1976 *cit. in* Santos *et al.* 2008). Assim sendo, Puerto (1989) *cit. in* Santos *et al.* (2008), referem que as cerejeiras preferem solos fundos, bem drenados, com uma textura média, e ligeiramente ácidos.

Existem poucas referências sobre as características destas cultivares e as que existem são sempre referentes à cultivar De Saco da Cova da Beira. Esta cultivar tem uma boa adaptabilidade aos porta-enxertos, sendo compatível na enxertia com grande parte dos cavalos existentes, que devem, no entanto, ser escolhidos de acordo com as características edáficas do local (Costa, 2006). Em relação às exigências climáticas, a cerejeira está bem adaptada a climas temperados, necessitando de frio para a quebra da dormência e para os seus gomos se desenvolverem normalmente (Janick, 1965 *cit. in* Santos *et al.*, 2008). A 'De Saco da Cova da Beira' necessita de 1150 unidades de frio (UF) para uma quebra de dormência regular e um abrolhamento homogêneo (Carvalho, 1994).

A 'De Saco da Cova da Beira' é uma cultivar de porte retumbante e de ramificação média. Segundo Costa (2006), apresenta uma floração tardia, cerca de 10 dias após a 'Burlat', e uma maturação também tardia, que de acordo com Campelo *et. al* (2005) *cit. in* Santos *et al.* (2008) se situa entre a 2ª e 3ª semanas de Junho. Os gomos florais aparecem em geral nos esporões rectos, agrupados em ramalhete (ramalhetes de Maio), mas podem também aparecer isoladamente em gomos florais isolados na base dos ramos de 1 ano (Santos *et al.*, 2008). De acordo com Costa (2006), a cerejeira 'De Saco da Cova da Beira' é muito produtiva. Os seus frutos podem permanecer na árvore por uma semana sem perda de qualidade e apresentam uma boa resistência ao rachamento e ao transporte. A cereja é cordiforme, de cor púrpura, com um peso e calibre médios e apresenta um pedúnculo grande que facilita a apanha do fruto. A polpa é de coloração vermelha escura de suculência mediana, com um elevado teor de açúcares e um nível de acidez médio (Costa, 2006).

Santos *et al.* (2008) apontam duas doenças particularmente propensas ao aparecimento em muitas cultivares de cerejeira: o cancro bacteriano, causado por *Pseudomonas* sp. em

regiões frias; e *Monilinia fructicola*, fungo que se desenvolve quando há condições de humidade elevada. Quanto a pragas, o afídeo negro (*Mysus cerasi*) é aquele que maiores prejuízos provoca na cultura.

### **2.3. Polinização e vingamento em cerejeira**

A polinização é o processo de transporte dos grãos de pólen das anteras para o estigma, designando-se vingamento quando esses grãos de pólen fecundam os óvulos existentes no ovário, levando à formação de frutos (Tavares, 2006).

Edin *et al.* (1997) *cit. in* Santos *et al.* (2008) referem que a polinização apenas ocorre durante a época de receptividade do estigma, que vai desde a abertura da flor até à sua senescência (dessecamento do estigma). No caso da cerejeira este período corresponde a cerca de 3 a 5 dias. O pólen liberta-se das anteras algumas horas após as flores abrirem, e tem uma temperatura óptima de germinação nos estigmas perto dos 20 °C, sendo a germinação praticamente nula abaixo de 5 – 6 °C. Em muitas espécies, como é o caso das cerejeiras, os grãos de pólen sofrem uma desidratação programada antes de se libertarem das anteras, ficando metabolicamente inactivos. Este processo é também acompanhado por uma conversão do açúcar presente no pólen em amido. Quando um grão de pólen desidratado chega a um estigma, absorve a água presente na superfície do estigma e readquire a actividade metabólica, dando início à germinação do tubo polínico se as condições forem favoráveis (Bots & Mariani, 2005).

Por outro lado, a longevidade da viabilidade dos óvulos não vai além dos 4 a 5 dias e por isso, no total, o período de polinização efectiva numa cerejeira é de cerca de 4 dias, podendo ser um pouco maior com tempo mais fresco e ligeiramente mais curto quando as temperaturas são mais elevadas, pois existe uma elevada relação de dependência entre a temperatura e a celeridade dos processos fisiológicos (Santos *et al.*, 2008).

Cerca de 80 a 95 % da polinização é realizada por insectos polinizadores, em especial as abelhas domésticas (*Apis mellifera* L.), que começam a sua actividade a partir dos 10 – 12 °C de temperatura, aumentando progressivamente até aos 25 °C (Edin *et al.*, 1997 *cit. in* Santos *et al.*, 2008). O vento também afecta as abelhas, sendo a sua actividade drasticamente reduzida quando a velocidade do ar é superior a 3 – 5 m/s.

A polinização culmina com a germinação do pólen e crescimento do tubo polínico ao longo do estilete das flores, e ocorre a uma temperatura óptima que ronda os 22 a 25 °C. Devido à flutuação térmica inerente à alternância dia-noite, os tubos polínicos demoram, segundo Bargioni (1980) *cit. in* Santos *et al.* (2008), pelo menos dois dias a crescer, e a sua velocidade de crescimento é permanentemente controlada pela temperatura, parando quando ela é inferior a 5 – 6 °C.

Uma polinização deficiente leva a baixas taxas de vingamento, originando baixas produtividades. Mas para além da ineficácia da polinização, que decorre por exemplo da ausência de pólen, da sua destruição por agentes externos, ou por não se verificar a sua transferência, o vingamento pode também não ocorrer ou ocorrer em condições deficientes, por causa de aspectos não relacionados com o processo de polinização. São disso exemplo a esterilidade do pólen e/ou dos óvulos, a incapacidade dos tubos polínicos se desenvolverem através dos estiletos, aborto seminal causado por irregularidades genéticas, problemas nutricionais ou ainda condições climáticas adversas (Tavares, 2006).

Sendo a polinização e o vingamento fases tão importantes para o sucesso da cultura, o seu conhecimento é da maior importância para os fruticultores. E embora já existam métodos estabelecidos para permitir o acompanhamento e avaliação da qualidade destes dois processos (Bolat & Pirlak, 1999; Dafni & Firmage, 2000; Firmage & Dafni, 2001), poucos são os que estão bem adaptados às condições de campo, acabando por ser de pouca utilidade para os produtores de cereja.

No campo, a polinização pode ser avaliada pela percentagem de viabilidade do pólen. O termo viabilidade é geralmente definido como “tendo a capacidade de viver, crescer, germinar ou desenvolver”. No entanto, este termo tem sido usado para descrever a germinação dos grãos de pólen no estigma, a germinação dos grãos de pólen *in vitro*, e ainda o resultado de vários procedimentos de coloração (Firmage & Dafni, 2001). A forma mais precisa de avaliar a viabilidade do pólen é testar a sua capacidade de fecundação e formação do fruto (vingamento), no entanto, apesar da formação do fruto indicar certamente a viabilidade do pólen que lhe deu origem, o inverso não é necessariamente verdadeiro, ou seja, a não ocorrência de vingamentos após a polinização não indica obrigatoriamente falta de viabilidade do pólen. Existem numerosos métodos para determinar a viabilidade do pólen e estes dependem de muitos factores, tais como: a actividade enzimática, o conteúdo citoplasmático, a integridade do plasmalema e as condições físicas em que o teste ocorre (temperatura, exposição ao ar, etc.). Nenhum destes métodos nos permite confirmar se uma amostra de pólen está ou não viável, se tem ou não a capacidade de fecundar e originar frutos, estes métodos apenas nos dão uma estimativa. Têm sido referidas cinco abordagens diferentes para testar a viabilidade do pólen: medições de respiração ou condutividade química dos lixiviados do pólen (usada raramente); técnicas de coloração (corantes vitais para a presença de citoplasma e corantes que indicam a actividade enzimática); germinação (*in vivo* e *in vitro*); conteúdo em prolina; e avaliação do número de vingamentos, estas últimas usadas mais comumente. Em relação aos procedimentos de coloração, são vários os testes e reagentes que podem ser usados para testar a viabilidade do pólen (Dafni & Firmage, 2000). São disso exemplo:



- Combinação de corantes vitais, que mostram a presença de citoplasma,
- Corante Alexander's,
- Corantes de tetrazólio que indicam a redução de um sal incolor a uma substância corada na presença da enzima dehidrogenase,
- Teste do X-Gal, que cora uma substância proveniente da hidrólise dos galactósidos por acção da  $\beta$ -galactosidase,
- Reagente de Baker que mostra a actividade da álcool dehidrogenase,
- Teste de Benzidine que revela a actividade da peroxidase,
- Teste de Isatin que indica a presença de prolina,
- FCR (fluorescein diacetate reaction) que testa o plasmalema e a integridade da membrana plasmática.

É ainda referido noutros estudos o uso do IKI (iodeto de potássio), que cora o amido presente nos grãos de pólen, como indicador da viabilidade dos grãos de pólen (Bolat & Pirlak, 1999; Pirlak & Gülerüç, 2005).

Algumas limitações são apontadas a estes testes de coloração, nomeadamente a tendência de certos corantes utilizados sobrestimarem a viabilidade, em muitos casos a inexistência de qualquer correlação com a germinação e ainda a incapacidade de muitos dos corantes utilizados actuarem apenas nos grãos de pólen que têm realmente a capacidade de germinar e fecundar, corando indiscriminadamente tanto os grãos de pólen viáveis como também os inviáveis (Dafni & Firmage, 2000). A actuação destes corantes depende da fisiologia dos grãos de pólen de cada espécie. Apesar destas limitações, alguns destes testes têm sido usados para testar a viabilidade dos grãos de pólen da espécie *Prunus avium*, pois constituem um método rápido e objectivo para, em condições de campo e de forma expedita, avaliar a qualidade do pólen das cerejeiras (Bolat & Pirlak, 1999).

A germinação dos grãos de pólen *in vitro* é uma metodologia mais rigorosa, na medida em que a viabilidade é mais objectivamente mensurável (o pólen germinou ou não). O inconveniente é o facto de este método ser mais demorado, e necessitar de condições mais exigentes, uma vez que a germinação é influenciada pela temperatura, hidratação, densidade do pólen, % de sacarose e pela presença ou ausência de certos iões (Firmage & Dafni, 2001), não sendo um método ideal para realizar em condições de campo.

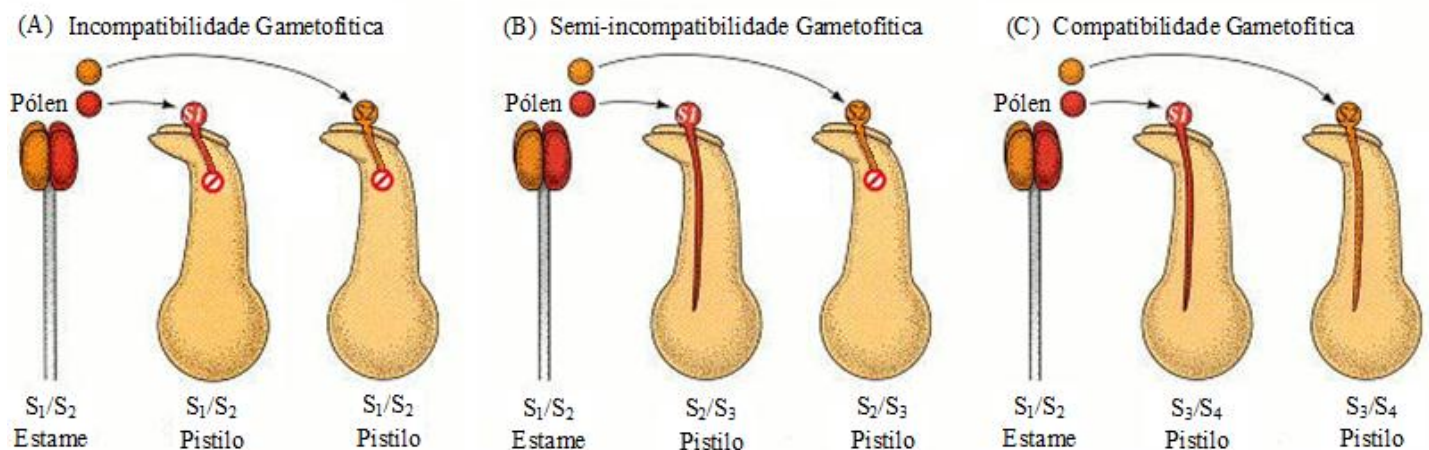
## **2.4. Incompatibilidade em Rosáceas**

### **2.4.1. Sistema de incompatibilidade gametofítica (GSI)**

O sistema de incompatibilidade gametofítica (GSI), também denominado por sistema de auto-incompatibilidade, é um mecanismo presente em plantas com flores hermafroditas que

impede a auto-fecundação, permitindo um aumento da variabilidade genética ao promover o cruzamento entre variedades diferentes, contribuindo assim para a evolução da espécie (Wang *et al.*, 2010). Entre um terço a metade de todas as plantas com flor apresentam este sistema (Roalson & McCubbin, 2003 *cit. in* Tavares, 2006).

O GSI está presente em praticamente todas as espécies fruteiras, encontrando-se também presente em outras Rosáceas e em plantas da família das Solanáceas e Escrofulariáceas. Este mecanismo é determinado pelo genótipo haploide de cada grão de pólen e pelo genótipo diploide dos tecidos do pistilo (Crane & Lawrence, 1929 e McCubbin and Kao, 2000 ambos *cit. in* Vaughan *et al.*, 2008), ocorrendo incompatibilidade quando os alelos S são comuns entre o pólen e o pistilo. Esta incompatibilidade traduz-se na inibição do crescimento do tubo polínico, ao nível do estilete, do grão de pólen que possui o alelo comum ao pistilo (Tavares, 2006). Pode ainda ser feita a distinção entre incompatibilidade total, quando todos os grãos de pólen contêm alelos presentes no pistilo; e semi-incompatibilidade, quando uma parte dos grãos de pólen contêm um alelo diferente dos que existem no pistilo. Quando todos os grãos de pólen têm o seu alelo diferente dos que existem no pistilo, não existe incompatibilidade gametofítica (Figura 1).



**Figura 1** Descrição esquemática da germinação do pólen no estigma e inibição do crescimento, ao nível do estilete, do tubo polínico do grão de pólen que possui o alelo comum ao pistilo, resultando nas três formas possíveis: (A) Incompatibilidade gametofítica; (B) Semi-incompatibilidade gametofítica e (C) Compatibilidade gametofítica. (Baseada numa figura retirada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=dbio&part=A4956>)

O sistema de auto incompatibilidade é determinado pelo *locus* S, que é um *locus* multialélico contendo alguns genes, entre os quais um gene com múltiplos alelos que codifica uma ribonuclease específica S (S-RNase) que apenas é sintetizada nos pistilos das flores antes da sua abertura (ântese) e controla a especificidade do próprio pistilo (Tavares, 2006). Uma vez que o gene da S-RNase controla apenas a parte do pistilo, tem sido sugerido que a parte do pólen é regulada por um outro gene que se pensa estar geneticamente relacionado ao gene da S-RNase. Este gene S específico do pólen foi identificado em algumas espécies,

nomeadamente em alperce, amêndoa e cerejeira (Goldway *et al.*, 2007). Como esperado, o gene que governa a componente de especificidade do pólen é expresso especificamente no pólen e é altamente polimórfico (McClure, 2006 *cit in*. Vaughan *et al.*, 2008). O alinhamento de sequências tem revelado que este gene codifica uma proteína F-Box, tendo sido designada SLF (S-locus F-box) ou SFB (S-haplotype specific F-box), dependendo do laboratório que a identificou. Os genes F-Box fazem parte da SCF (Skp1, Cullin, F-Box) um complexo do proteossoma do sistema da ubiquitin/26S (Goldway *et al.*, 2007). Estudos recentes em cerejeira têm revelado que a deleção ou mutação do gene SFB tem resultado na quebra do mecanismo GSI, mostrando evidências de que o gene SFB codifica o potencial determinante da especificidade do pólen do sistema de incompatibilidade gametofítica (Vaughan *et al.*, 2008).

O modelo actualmente aceite para explicar a especificidade de rejeição do pólen pela S-RNase, é o modelo da activação/inibição. Este modelo sugere que poucos dias antes da ântese, o pistilo começa a sintetizar S-RNases, de modo que, quando a flor abre, as S-RNases estão já presentes no lúmen do pistilo. Um grão de pólen que poise no estigma começa a germinar para o interior do pistilo e as S-RNases entram para dentro do tubo polínico, independentemente do seu haplótipo. No tubo polínico, as S-RNases que apresentam um haplótipo diferente do haplótipo do grão de pólen são “marcadas” pelas SLF/SFB, ligando uma pequena proteína chamada ubiquitina, para posteriormente serem degradadas pelos proteossomas, enquanto que as S-RNases que apresentam um haplótipo idêntico ao do pólen são protegidas da degradação, possivelmente também pela proteína SLF/SFB. Como consequência, as S-RNases que não foram degradadas, vão actuar como citotoxinas degradando por sua vez o RNA do pólen necessário para a tradução proteica, levando a uma incapacidade de produzir novas proteínas, interrompendo em último caso o crescimento do tubo polínico. Apesar deste modelo ser aquele que actualmente melhor explica o funcionamento e actuação da S-RNase, alguns dados permanecem inconsistentes com este modelo, estando ainda por identificar alguns dos intervenientes neste processo (Newbigin & Uyenoyama, 2005; Goldway *et al.*, 2007).

#### **2.4.2. Estrutura e localização do gene que codifica a S-RNase**

Tanto o gene que codifica a S-RNase como o que codifica a proteína SLF/SFB encontram-se de facto ligados no *locus* S, onde se pensa não haver recombinação entre ambos, pois resultaria num haplótipo S não funcional, com perda da auto-incompatibilidade. Como ambos os genes se encontram num só *locus*, foi escolhida a designação “haplótipo S” para referir o *locus* complexo e “alelos S” para referir cada um dos genes polimórficos de um

haplótipo S. A distância entre estes dois genes pode variar entre 380 pb em cerejeira até 40 Kb nas Solanáceas (Ikeda *et al.*, 2005 *cit in*. Tavares, 2006).

As S-RNases possuem uma estrutura muito semelhante nas três famílias de plantas que têm GSI. Estas proteínas apresentam em comum seis regiões altamente conservadas, que incluem o sinal peptídico e cinco domínios conservados (C1, C2, C3, CR4 e C5), e apresentam uma região hipervariável (HV) localizada entre os domínios C2 e C3. Nas Rosáceas, o domínio CR4 é específico desta família, não apresentando qualquer homologia com o correspondente domínio C4 das Solanáceas e Escrofulariáceas. Do mesmo modo apenas uma região hipervariável foi identificada nas Rosáceas (HVR), enquanto nas outras duas famílias foram identificadas duas regiões (HV<sub>a</sub>, localizado na mesma região que HVR entre C2 e C3, e HV<sub>b</sub>) (Ma & Oliveira, 2002; Wunsch & Hormaza, 2004a; Vaughan *et al.*, 2008). As S-RNases das Rosáceas apresentam ainda um único intrão inserido no interior da região hipervariável, a excepção é feita para as cerejeiras e algumas S-RNases de amendoeira, que possuem um outro intrão na junção entre o sinal peptídico e a proteína madura (Wunsch & Hormaza, 2004a). Ao contrário dos exões, que irão dar origem à proteína funcional e que apresentam uma elevada homogeneidade de tamanho entre os vários haplótipos, os intrões apresentam um número muito variável de pb, traduzindo-se em diferentes tamanhos que conferem ao gene um elevado polimorfismo, no qual se baseiam algumas das metodologias usadas na identificação dos alelos S (Tavares, 2006; Vaughan *et al.* 2008).

Pensa-se que tanto as regiões conservadas como as hipervariáveis são importantes para o reconhecimento dos alelos S e para a iniciação da resposta de auto-incompatibilidade (Vaughan *et al.*, 2008), conferindo especificidade às S-RNases. Os domínios C1, CR4 e C5 correspondem a regiões da S-RNase que possuem na maioria aminoácidos hidrofóbicos, que se acredita que estejam relacionados com a estabilização da estrutura enzimática (Tavares, 2006).

#### **2.4.3. Estudos moleculares em GSI**

Actualmente são três as formas mais comuns para se determinar a incompatibilidade entre cultivares: - a identificação dos alelos S das várias cultivares;

- cruzamentos controlados entre cultivares e contagem dos frutos vingados;
- avaliação da evolução da penetração do tubo polínico no óvulo (método *in vivo*).

Durante muito tempo, a compatibilidade entre cultivares era estabelecida apenas com base em critérios empíricos, através da realização de ensaios de campo. Devido à grande dependência dos factores ambientais e fisiológicos, tanto os cruzamentos controlados como a observação do desenvolvimento do tubo polínico, nem sempre conduzem a resultados

conclusivos e são geralmente muito demorados e trabalhosos. Além disso, estes métodos não permitem uma fácil diferenciação entre semi-compatibilidade (em que apenas 50% dos grãos de pólen se desenvolvem) e compatibilidade total (100% dos grãos de pólen podem germinar e crescer) (Tavares, 2006; Mota et al., 2009).

Com a identificação dos alelos S, responsáveis pela codificação das S-RNases que determinam o mecanismo de auto-incompatibilidade, o estudo de compatibilidade entre cultivares tornou-se mais expedito e livre de influências ambientais ou fisiológicas. Este tipo de análise pode ser feito utilizando apenas uma pequena quantidade de material foliar e constitui uma importante ferramenta para determinar os níveis de incompatibilidade, que juntamente com os ensaios de campo, permitem uma maior eficiência na escolha de boas polinizadoras (Mota & Oliveira, 2005). Este método pode utilizar directamente os polimorfismos das S-RNases, que são detectados pela análise de migração das proteínas num gel apropriado, ou pode recorrer-se à amplificação dos alelos S, utilizando iniciadores específicos, através da reacção da polimerase em cadeia (PCR), distinguindo-se os diferentes alelos pelo tamanho dos fragmentos amplificados. Pode ainda ser necessário fazer-se uma digestão de restrição dos produtos amplificados, no caso de alelos S diferentes darem origem a produtos com o mesmo tamanho (Tavares, 2006).

Nos últimos anos têm sido realizados vários trabalhos com o objectivo de identificar os haplótipos das S-RNases em diversas fruteiras, e particularmente em cerejeira. Crane e Brown em 1937 identificaram originalmente seis alelos de *Prunus avium* ( $S_1$  ao  $S_6$ ) através de experiências de polinizações cruzadas e testes de parentesco. Estes só mais tarde (final dos anos 90) foram caracterizados ao nível molecular (Vaughan et al., 2008). Novos alelos ( $S_7$  ao  $S_{16}$ ) foram identificados utilizando técnicas de biologia molecular, embora tudo indica que os alelos  $S_8$ ,  $S_{11}$  e  $S_{15}$  são idênticos ao  $S_3$ ,  $S_7$  e  $S_5$ , respectivamente (Sonneveld et al., 2001; Sonneveld et al., 2003). Foram ainda identificadas mais seis S-RNases ( $S_{17}$  ao  $S_{22}$ ) em populações belgas de cerejeira brava e mais três,  $S_{23}$  ao  $S_{25}$ , em cerejeiras espanholas. No entanto, alinhamentos simples mostraram que o  $S_{23}$  e  $S_{25}$  são sinónimos do  $S_{14}$  e  $S_{21}$  respectivamente, e o  $S_{24}$  parece ser um caso curioso de *silico splicing*, em que provavelmente devido a uma mutação, cerca de metade deste alelo apresenta uma constituição idêntica ao  $S_{22}$  sendo a outra metade idêntica ao  $S_6$  (Vaughan et al., 2008).

Os novos alelos identificados têm sido reunidos numa tabela de cultivares actualizada, que contém 247 cultivares de cerejeira agrupadas em 26 grupos de incompatibilidade e um grupo de auto-compatibilidade (Tobutt et al., 2004 cit in. Gisbert et al., 2008). Cultivares que são auto-incompatíveis mas que apresentam compatibilidade com todos os grupos de incompatibilidade conhecidos, são chamadas dadores universais. Estas cultivares constituem um grupo ao qual tem sido dada a designação “grupo 0”, não se sabendo ao

certo se essas cultivares têm novos alelos ou se são combinações raras de alelos conhecidos (Wiersma *et al.*, 2001; Schuster *et al.*, 2007). Alguns trabalhos realizados utilizando a irradiação de pólen, levaram ao aparecimento de algumas selecções de cultivares auto-compatíveis. A auto-compatibilidade é atribuída a uma forma mutante do alelo  $S_4$ , designada  $S_4'$ , que perdeu a capacidade de originar S-RNases (Sonneveld *et al.*, 2001). Recentemente, Vaughan *et al.* (2008) identificaram e caracterizaram seis novos alelos S de *Prunus avium*, do  $S_{27}$  ao  $S_{32}$ .

#### 2.4.4. Implicações na cultura das cerejeiras 'De Saco'

Embora já tenham sido identificados os alelos S de várias cultivares de cerejeira utilizando processos moleculares, ainda não foram feitos quaisquer estudos de compatibilidade genética para cultivares portuguesas. Suspeita-se que as baixas produtividades, que ocorrem com frequência em ambas as cultivares De Saco, poderão muitas vezes ser devidas ao sistema de incompatibilidade gametofítica existente e ao uso de cultivares polinizadoras incompatíveis com as cerejeiras 'De Saco'.

Sendo a incompatibilidade gametofítica provavelmente a principal causa para o fraco vingamento destas variedades, o conhecimento dos alelos S das duas cultivares De Saco é extremamente importante. Assim sendo, uma boa estratégia para a sua identificação é a amplificação por PCR das sequências flanqueadas por iniciadores desenhados a partir de regiões conservadas das sequências de DNA que codificam as diferentes S-RNases. A identificação dos alelos S permitirá a escolha de polinizadoras totalmente compatíveis com estas cultivares portuguesas, aumentando o seu potencial produtivo.

Para a obtenção de produtividades aceitáveis nos pomares de cerejeiras 'De Saco', a escolha das cultivares polinizadoras é um factor extremamente importante. Os critérios utilizados na sua escolha devem ser, para além da selecção de cultivares compatíveis, em primeiro lugar a sobreposição total, ou pelo menos parcial, dos períodos de floração com as cultivares 'De Saco' e, em segundo, outros aspectos de ordem técnico-comercial que confirmem às polinizadoras particularidades que as tornem preferíveis em detrimento de outras, como por exemplo as características do fruto (diâmetro, teor de açúcares, tamanho do pedúnculo, etc.), a tolerância a certas propriedades físicas do solo (como por exemplo a baixa permeabilidade), ou ainda a resistência a determinadas pragas e/ou doenças.

No pomar, a distribuição das variedades e das suas polinizadoras também deve ser bem concebida, não devendo, na opinião de Edin *et al.* (1997) *cit in*. Santos *et al.* (2008), ficar a polinizadora a mais de 12 – 15 m da variedade a polinizar. As polinizadoras devem ser distribuídas em blocos de duas linhas, quando ambas as cultivares têm a mesma importância comercial, ou em blocos de três ou quatro linhas, sendo neste caso

recomendável inserir nas linhas centrais algumas árvores de uma outra cultivar polinizadora (Santos *et al.*, 2008). É também desejável, que as polinizadoras apresentem regularidade na produção e que produzam pólen viável e com bom poder germinativo. Devem ainda produzir cerejas com interesse comercial para uma maior rendibilidade do pomar (Tavares, 2006). Naturalmente, para que haja uma efectiva polinização, é necessário que as condições climáticas sejam favoráveis e que haja insectos polinizadores, que garantam a transferência dos grãos de pólen para o estigma das flores a polinizar (Tavares, 2006); uma boa prática poderá ser a colocação temporária de colmeias no pomar (4 a 6 por hectare) durante o período de floração (Santos *et al.*, 2008).

### 3. Materiais e métodos

Este trabalho experimental apresenta duas partes distintas, que serão abordadas neste capítulo em separado.

A primeira parte consistiu no estabelecimento de um protocolo de campo para acompanhar e avaliar o vingamento da cultivar de cerejeira De Saco do Douro. Para isso fizeram-se cruzamentos controlados entre a ‘De Saco do Douro’ e quatro possíveis cultivares polinizadoras de interesse, sendo que uma das polinizadoras era a própria ‘De Saco do Douro’, de forma a simular a auto-polinização. A viabilidade e potencial de germinação dos pólenes a utilizar foram avaliados por diferentes métodos *in vitro* para averiguar a sua eficácia e aplicabilidade em condições de campo. Foram testados quatro procedimentos: três processos envolvendo a coloração dos grãos de pólen com corantes vitais, e um procedimento envolvendo a germinação dos grãos de pólen em placas com gel de agar e sacarose.

A identificação e caracterização dos alelos S das cultivares De Saco do Douro e De Saco da Cova da Beira constituiu a segunda parte deste trabalho. O DNA genómico foi extraído de cada cultivar e as sequências nucleotídicas correspondentes aos alelos S foram amplificadas, utilizando iniciadores específicos desenhados a partir de regiões conservadas de S-RNases de cerejeira já conhecidas, clonadas e sequenciadas, sendo o conteúdo em alelos S deduzido por homologia com sequências já armazenadas no GenBank.

Segue-se uma descrição pormenorizada do procedimento seguido, remetendo para anexos a informação mais técnica e detalhada.

#### 3.1. Ensaio para a determinação do vingamento na cultivar De Saco do Douro e avaliação da viabilidade do pólen das cultivares Burlat, Bing, Van e De Saco do Douro

##### 3.1.1. Ensaio para a determinação do vingamento

- Escolha das árvores no pomar

Neste ensaio foram utilizados oito clones (C1, C2, C3, C4, SJ, S, V e VV) presumivelmente da cultivar De Saco do Douro. Estas oito árvores estão distribuídas por cinco pomares localizados em cinco quintas diferentes, todas na região de Resende.

Foram escolhidas oito árvores com um porte equilibrado, isentas de doenças e livres de pragas, nomeadamente formigas. Houve o cuidado de escolher as árvores localizadas nos sítios mais resguardados longe dos caminhos de passagem e longe da influência de quaisquer factores externos (como por exemplo passagens de máquinas) que possam



interferir com a polinização das flores e vingamento dos frutos. Uma descrição pormenorizada da localização e das características mais relevantes de cada árvore encontra-se no Anexo II. As condições climáticas da região de Vila Real, que servem de referência para a região de Resende, correspondentes ao período em que decorreram os ensaios de campo (Abril), estão descritas no Anexo III.

As cultivares polinizadoras escolhidas para a realização deste ensaio foram a 'Burlat', 'Bing', 'Van' e a própria 'De Saco do Douro' pelas seguintes razões:

- Por estas três cultivares polinizadoras terem um período de floração coincidente com o período de floração da 'De Saco do Douro';
- A 'Burlat', por ser a cultivar mais temporã na região, sendo por isso também a mais cultivada na região de Resende, local onde foram efectuados os ensaios;
- A 'Bing', por ser uma cultivar que está bem adaptada à região e produz frutos com bom teor em açúcar, sendo também das variedades mais cultivadas;
- A 'Van', por ser a principal cultivar da região utilizada como polinizadora da Burlat, sendo também por isso muito utilizada;
- A 'De Saco do Douro' foi também utilizada como cultivar polinizadora para efectuar o ensaio de auto-polinização.

- Emasculação e polinização das flores

Depois de se terem escolhido os ramos e marcado os esporões conforme está detalhadamente descrito no Anexo IV, foram emasculadas apenas as flores que se encontravam no estado de balão, num total de cerca de 200 flores distribuídas pelas oito árvores. Após a emasculação, as flores foram imediatamente cobertas com um saco de algodão do Egipto para garantir que estas não fossem polinizadas com outros pólenes que não os provenientes das polinizadoras seleccionadas. No mesmo dia em que se fez a emasculação foram recolhidas cerca de 200 flores no estado de balão das três polinizadoras e de uma das árvores 'De Saco do Douro' (o clone VV). As anteras foram recolhidas e deixadas a secar à temperatura ambiente (20 °C) durante 48 horas a fim de libertarem o pólen. A polinização das árvores 'De Saco do Douro' foi efectuada três dias depois, com uma parte do pólen recolhido das polinizadoras. Com a ajuda de um pincel, a polinização foi efectuada aplicando o pólen com uma só passagem no estigma da flor anteriormente emasculada. As flores foram novamente tapadas de imediato com o saco de algodão, ficando estes colocados até ao vingamento do fruto. Dois dias depois da primeira polinização fez-se uma segunda aplicação de pólen seguindo o mesmo procedimento, e utilizando-se parte do pólen recolhido anteriormente. O leitor é novamente remetido para o Anexo IV onde se encontra uma descrição mais detalhada de todo este procedimento.

- Taxa de vingamento

Quinze dias após a segunda polinização procedeu-se à contagem dos vingamentos e determinou-se a taxa de vingamento da cultivar De Saco do Douro para cada cruzamento, calculando a razão entre o número de frutos vingados e o número de flores polinizadas. Dezoito dias após a primeira contagem dos vingamentos fez-se uma segunda determinação da taxa de vingamento.

### **3.1.2 Ensaio para testar a viabilidade e o potencial de germinação do pólen**

Os ensaios para testar a viabilidade e o potencial de germinação do pólen foram realizados na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, para criar um ambiente de temperatura estabilizada e ter um microscópio óptico para uma melhor visualização e contagem dos grãos de pólen.

Estes ensaios foram realizados no mesmo dia em que se fizeram as polinizações, tendo sido utilizado o pólen que fora previamente guardado para a realização destes ensaios em conjunto com o pólen que sobrou das polinizações. Foram testados quatro procedimentos: em três processos foram usados corantes para determinar a viabilidade dos grãos de pólen; num outro procedimento foi determinado o potencial de germinação através do desenvolvimento dos grãos de pólen em placas com gel de agar e sacarose. Estes mesmos testes foram repetidos com o pólen estéril (o pólen ficou a incubar numa estufa a 80 °C durante 2 horas), para servir de testes controlo.

- Coloração dos grãos de pólen

Neste procedimento foram utilizados três soluções com corantes vitais: iodeto de potássio (IKI), 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e X-Gal;

Procedeu-se a uma suspensão dos grãos de pólen de cada uma das cultivares polinizadoras ('Burlat', 'Bing', 'Van' e 'De Saco do Douro') em água esterilizada e fizeram-se preparações, colocando em cada lâmina de vidro 20 µl da suspensão, ao qual se juntaram 20 µl de cada um dos reagentes corantes. Colocou-se de seguida uma lamela e os reagentes ficaram a actuar durante o tempo necessário dependendo do corante de cada teste:

- o IKI ficou a actuar durante dois minutos à temperatura ambiente;
- o TTC ficou a actuar durante duas horas à temperatura ambiente;
- o X-Gal ficou a actuar durante 30 minutos no escuro e a 37 °C na estufa.

No final observaram-se as preparações no microscópio óptico com uma ampliação 100x e efectuaram-se as contagens dos grãos de pólen corados. A percentagem de viabilidade do pólen é dada pela equação:

$$\text{Percentagem de viabilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de grãos de pólen corados}}{\text{n}^\circ \text{ total de grãos de pólen}} \times 100 \%$$

A descrição detalhada deste procedimento encontra-se no Anexo IV, estando a preparação das soluções descrita no Anexo V.

- Germinação dos grãos de pólen

Numa placa de Petri com um gel de agar e sacarose, cuja preparação está descrita no Anexo V, foram dispersos 200 µl da suspensão dos grãos de pólen previamente preparada. Depois de selada com papel Parafilm® e embrulhada em folha de alumínio, colocou-se a placa de germinação numa estufa a 25 °C durante 24 horas. No final observaram-se as placas ao microscópio óptico e efectuaram-se as contagens dos grãos de pólen germinados. Foram considerados germinados todos os grãos cujo tubo polínico tinha um comprimento igual ou superior ao diâmetro do grão de pólen. A taxa de germinação do pólen é dada pela equação:

$$\text{Taxa de germinação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de grãos de pólen germinados}}{\text{n}^\circ \text{ total de grãos de pólen}} \times 100 \%$$

A descrição detalhada deste procedimento encontra-se no Anexo IV.

### **3.2. Ensaio para a identificação dos alelos S das cultivares De Saco da Cova da Beira e De Saco do Douro**

#### **3.2.1 Origem e preparação do material vegetal**

Para a identificação das sequências genéticas parciais de alelos S das cultivares De Saco da Cova da Beira e De Saco do Douro utilizou-se material vegetal com três proveniências diferentes. Para a cultivar De Saco do Douro foram colhidas folhas duma das oito árvores utilizadas no ensaio para a avaliação dos vingamentos, foram também colhidas folhas de um clone da Colecção da Ex-Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade (ex-ENFVN) que estava referenciado como De Saco do Douro. Para a cultivar De Saco da Cova da Beira o material vegetal foi colhido de uma árvore da região do Fundão, referenciada como sendo desta cultivar; na ex-ENFVN não se encontrava esta cultivar na colecção. Foram utilizadas plantas equilibradas, isentas de fungos ou insectos que poderiam constituir fontes de contaminação para o DNA a extrair.

Para a extracção de DNA genómico, foram colhidas apenas as folhas jovens de cada genótipo: um genótipo da ex-ENFVN (referenciada como 'De Saco do Douro'), um genótipo

da Cova da Beira (referenciada como 'De Saco da Cova da Beira') e oito genótipos da região de Resende alegadamente da cultivar De Saco do Douro. As folhinhas foram colhidas directamente nos pomares, congeladas com choque de azoto líquido e conservadas a -80°C até à extracção.

### **3.2.2. Identificação das sequências genéticas parciais de alelos S de cerejeiras**

- Extracção de DNA genómico total

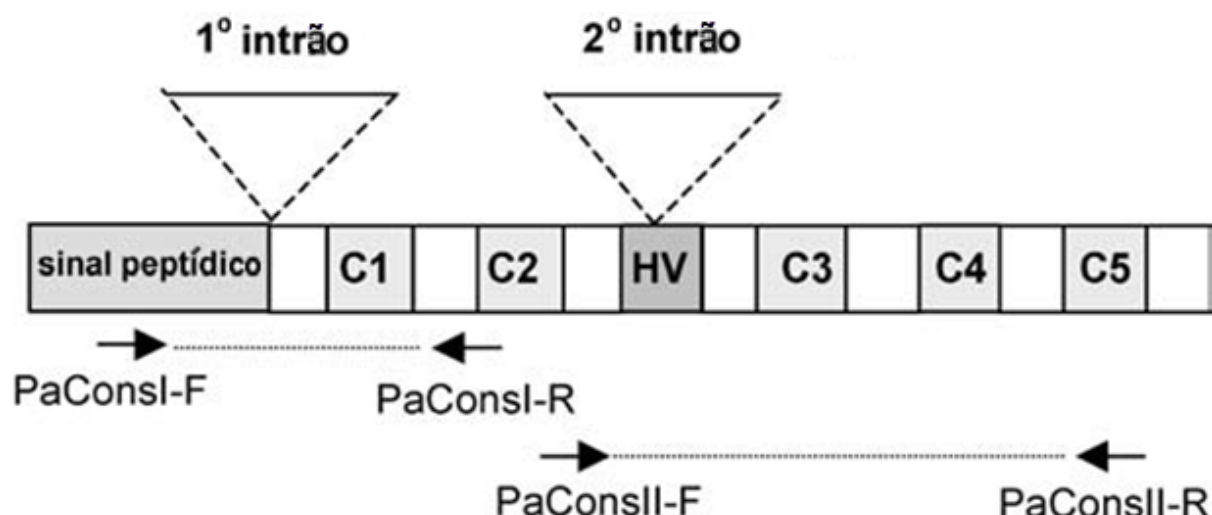
A extracção de DNA foi feita com base no método de extracção com CTAB de Doyle e Doyle (1990), com algumas adaptações.

Com um espectrofotómetro (GeneQuant *pro*) fez-se a quantificação do DNA e a avaliação da sua pureza através da determinação das absorvâncias a 230, 260 e 280 nm. A sua concentração foi também estimada por electroforese em gel de 1,2 % de agarose em 1X TAE, corado com brometo de etídio e visualizado num transiluminador de UV. Todo o processo de extracção e quantificação do DNA está detalhadamente descrito no Anexo VI.

- Amplificação de sequências parciais de alelos S

A amplificação das sequências parciais de alelos S foi feita por PCR, utilizando o DNA extraído e iniciadores específicos.

Foram utilizados iniciadores que emparelhavam em regiões conservadas das sequências nucleotídicas de alelos S de *Prunus avium* já armazenadas no GenBank, nomeadamente o S<sub>1</sub> (AJ298310), S<sub>2</sub> (AJ298311), S<sub>3</sub> (AJ298312), S<sub>4</sub> (AB028154), S<sub>5</sub> (AJ298314) e S<sub>6</sub> (AJ298315), utilizando-se o software ClustalW para fazer o seu alinhamento. Os pares PaConsl-F + PaConsl-R e PaConslI-F + PaConslI-R (Quadro 1) foram desenhados a partir de três regiões altamente conservadas das S-RNases de cerejeira: o sinal peptídico, C2 e C5 (Figura 2). O primeiro par, PaConsl-F e PaConsl-R, foi desenhado para amplificar o primeiro intrão, localizado entre as regiões que codificam o sinal peptídico e a proteína madura. O segundo par, PaConslI-F e PaConslI-R, foi desenhado para amplificar o segundo intrão, localizado na região RHV entre o C2 e o C3 (Figura 2) (Sonneveld et al., 2003).



**Figura 2** Estrutura da S-RNase de um *Prunus*, com a localização dos intrões e a posição dos iniciadores (não está à escala) (Sonneveld et al., 2003).

Quadro I – Sequências nucleotídicas dos iniciadores utilizados na reacção de PCR para a amplificação do primeiro e segundo intrão das S-RNases de cerejeira.

Iniciador <sup>1</sup>	Sequência 5' → 3'	Região amplificada
PaConsl-F	(C/A)CT TGT TCT TG(C/G) TTT (T/C)GC TTT CTT C	Região do sinal peptídico
PaConsl-R	CAT G(A/G)A TGG TGA A(A/G)T (T/A)TT GTA ATG G	até C2, incluindo o 1º intrão
PaConslI-F	G GCC AAG TAA TTA TTC AAA CC	C2 até
PaConslI-R	CA(T/A) AAC AAA (A/G)TA CCA CTT CAT GTA AC	C5, incluindo o 2º intrão
Pru-T2	TAT TAT TGA TTT TGC TTT CTT C	Região do sinal peptídico
SI-32	CAT AGG CCA TGA ATG GTG	até parte do segundo intrão

<sup>1</sup> F = forward, R = reverse

Foi igualmente utilizado o par de iniciadores Pru-T2 & SI-32 numa outra abordagem para amplificar por PCR os fragmentos que codificam as S-RNases da cultivar De Saco do Douro. Este par de iniciadores amplifica a região compreendida entre o sinal peptídico e parte do segundo intrão.

Estes iniciadores foram sintetizados na empresa STAB Vida.

Os fragmentos resultantes das reacções foram depois analisados por electroforese e visualizados em gel de agarose de 2 %.

Uma descrição detalhada das condições da amplificação para cada par de iniciadores encontra-se no Anexo VI.

- Clonagem no vector pCR®II

Logo após a amplificação, os fragmentos foram clonados no vector pCR®II (Invitrogen), utilizando a vantagem da Taq polimerase não ter actividade *proofreading*, deixando temporariamente as extremidades em A essenciais para a ligação ao vector pCR®II. Seguiram-se as normas do fabricante, sem se fazer qualquer purificação dos produtos de PCR (Anexo VI).

- Transformação

Depois de clonados, os fragmentos foram inseridos em bactérias competentes de *Escherichia coli* DH5α, através de um choque térmico de 45 segundos a 42 °C e transferência imediata para o gelo, permitindo a incorporação dos plasmídeos nas bactérias. As bactérias transformadas cresceram durante uma hora numa solução nutritiva sem antibiótico, a 37 °C e com agitação a 170 rpm. Depois foram espalhadas em placas de agar contendo um meio nutritivo e selectivo de LB com canamicina (50 µg/ml), tendo sido ainda impregnadas com X-Gal (Anexo V).

- Seleção das colónias a multiplicar para a obtenção do plasmídeo com *insert*

A diferenciação entre as colónias com e sem o *insert* nem sempre é conseguida com o método anterior, devido por exemplo, ao tamanho do fragmento. Quando os fragmentos apresentam um baixo peso molecular, o seu tamanho poderá não ser suficiente para impedir a expressão do gene *lacZ*, o que leva ao aparecimento de colónias de cor azul mas com o fragmento inserido. Para a detecção de *inserts* de reduzida dimensão, fez-se um PCR utilizando iniciadores específicos do vector pCR®II, directamente a partir de colónias brancas (que à partida têm o *insert*) seleccionadas aleatoriamente das placas de crescimento, efectuando-se a respectiva electroforese, de forma a analisar directamente o tamanho dos diferentes fragmentos amplificados. Fez-se uma repicagem das colónias seleccionadas para uma outra placa (placa mãe) (Anexo VI).

- Preparação de DNA plasmídico em pequena escala através de lise alcalina

As colónias consideradas positivas pelo método anterior foram colocadas a crescer num banho a 37 °C com agitação (170 rpm). A extracção do DNA plasmídico das bactérias após a sua multiplicação foi feita recorrendo ao método da lise alcalina. Os detalhes desta metodologia encontram-se no Anexo VI.

- Amplificação dos fragmentos para sequenciação

Fez-se um PCR de 100 µl para amplificação dos fragmentos clonados para posterior sequenciação. Para garantir que o fragmento inteiro codificador das S-RNases era sequenciado, incluindo a zona dos pares de iniciadores (PaConsl, PaConslI e Pru-T2 & Sl-32), foram utilizados iniciadores específicos do vector pCR®II (T7 SEQ e M13-48rev) (Anexo VI).

Os produtos da reacção de PCR foram corados com brometo de etídio e visualizados em gel de agarose 2 %.

- Purificação do DNA para a sequenciação

Fez-se uma purificação do DNA plasmídico com o kit de purificação QIAGEN PCR Purification Kit (QIAGEN), segundo as normas do fabricante que estão descritas no Anexo VI. Esta purificação pretende eliminar todos os elementos contaminantes que possam interferir com a reacção de sequenciação, como por exemplo os iniciadores, dNTPs, Taq Polimerase.

- Sequenciação

A sequenciação dos fragmentos foi efectuada pela empresa STAB Vida. Para cada fragmento foram sequenciadas as duas cadeias, uma utilizando o iniciador T7 fwd e a outra utilizando o iniciador M13 rev, para assim se evitar erros de sequenciação.

- Análise das sequências

As sequências obtidas foram analisadas com recurso ao software Chromas (Version 1.45 (32-bit)) e alinhadas utilizando o software ClustalW. A homologia entre as sequências foi analisada através do software BLAST. Para obter a sequência complementar invertida, sempre que necessário, recorreu-se ao software Sequence Manipulation Suite.

- Digestão enzimática com as enzimas de restrição Mbol e SacI

As enzimas Mbol e SacI foram escolhidas com a ajuda do software *NEB Cutter*, de acordo com os locais de restrição e com o tamanho esperado dos fragmentos resultantes da digestão. Estas enzimas foram colocadas juntamente com o produto da reacção de PCR (resultante da amplificação com o par de iniciadores PaConsl) numa estufa a 37 °C durante 2 horas. A reacção de digestão enzimática está descrita com maior detalhe no Anexo VI.

#### 4. Resultados

Os resultados dos ensaios para a avaliação da viabilidade do pólen das cultivares Burlat, Bing, Van e De Saco do Douro usadas como polinizadoras, e os resultados para a determinação da taxa de vingamento na cultivar De Saco do Douro, estão descritos nos quadros que se seguem.

No Quadro II, podemos observar as percentagens de germinação dos grãos de pólen de cada cultivar polinizadora pelo método da germinação em placas de gel de agar e sacarose. As taxas de germinação têm valores muito próximos uns dos outros, ainda assim, a cultivar Van foi aquela que apresentou uma maior percentagem de germinação e a 'Bing' a que teve uma taxa de germinação mais baixa. Na Figura 3 estão assinalados os grãos de pólen germinados da cultivar Burlat, cujos tubos polínicos têm um comprimento igual ou superior ao diâmetro do grão de pólen. Esta cultivar apresenta taxas de germinação muito semelhantes à 'De Saco do Douro'.

Nas placas de germinação com os grãos de pólen estéreis, não foi observado qualquer grão germinado.

Quadro II – Taxa de germinação do pólen viável das quatro cultivares polinizadoras

Cultivar	%
Bing	1,8
Burlat	3,1
Saco	3,2
Van	4,5



**Figura 3** Grãos de pólen da cultivar polinizadora Burlat germinados em placas de gel de agar e sacarose (ampliação 100x).



Nos Quadros III e IV estão apresentados os resultados dos três testes de coloração aplicados ao pólen de cada uma das quatro cultivares polinizadoras. O Quadro III diz respeito ao pólen fresco e o Quadro IV diz respeito ao pólen estéril. Em ambos os quadros é visível uma enorme variabilidade na taxa de coloração do pólen entre as várias cultivares, bem como entre cada teste. Em relação ao pólen fresco (Quadro III), obtivemos, para o teste do IKI, percentagens de coloração mais elevadas para as polinizadoras 'Bing' e 'Burlat' e mais reduzidas para as cultivares 'De Saco do Douro' e 'Van'. Já para o teste do TTC os resultados foram exactamente os opostos, com a 'Bing' e 'Burlat' a terem valores mais baixos e a 'De Saco do Douro' e 'Van' a terem percentagens mais elevadas.

Quadros III e IV – Contagem do número de grãos de pólen corados e não corados das quatro cultivares polinizadoras para cada teste de coloração e para o pólen fresco e estéril, respectivamente.

Quadro III

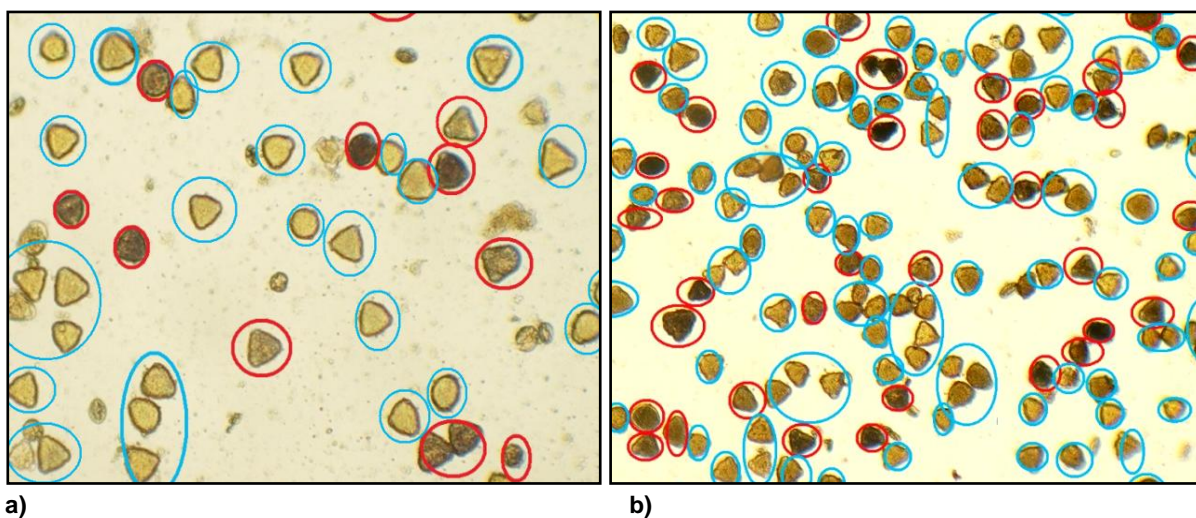
Teste	Variedade	Corados	Não corados	Total	% de corados
IKI	Bing	356	143	499	71,3%
	Burlat	139	381	520	26,7%
	Saco	88	374	462	19,0%
	Van	124	532	656	18,9%
TTC	Bing	21	453	474	4,4%
	Burlat	18	368	386	4,7%
	Saco	193	237	430	44,9%
	Van	139	379	518	26,8%
X-Gal	Bing	No teste do X-Gal não foi possível fazer uma distinção criteriosa entre os grãos de pólen corados e não corados			
	Burlat				
	Saco				
	Van				

Quadro IV

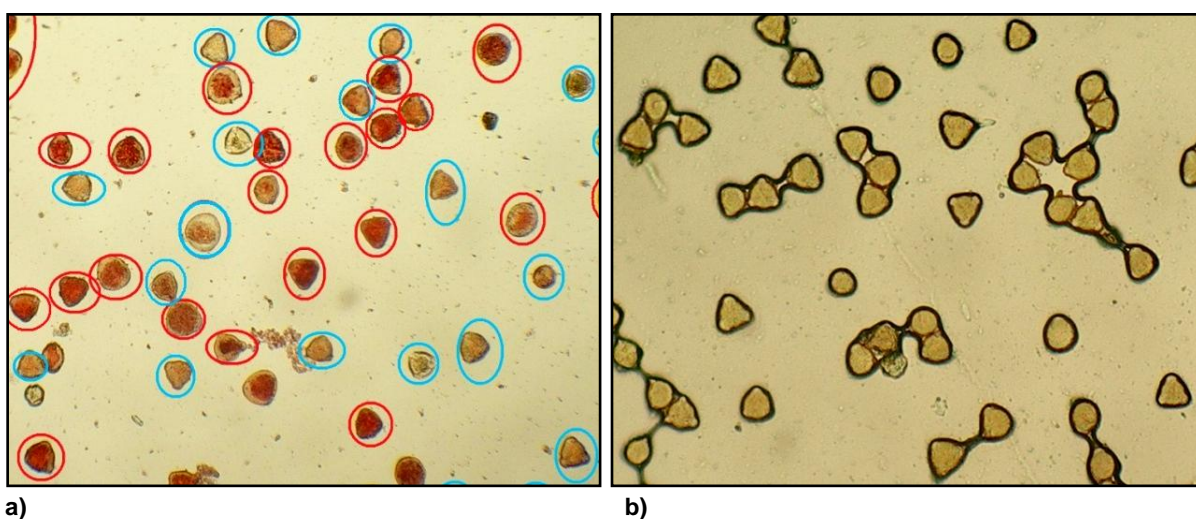
Teste	Variedade	Corados	Não corados	Total	% de corados
IKI	Bing	49	39	88	55,7%
	Burlat	156	32	188	83,0%
	Saco	144	408	552	26,1%
	Van	133	340	473	28,1%
TTC	Bing	0	131	131	0,0%
	Burlat	0	397	397	0,0%
	Saco	0	299	299	0,0%
	Van	0	641	641	0,0%
X-Gal	Bing	No teste do X-Gal não foi possível fazer uma distinção criteriosa entre os grãos de pólen corados e não corados			
	Burlat				
	Saco				
	Van				

No Quadro IV continuamos a ter grãos corados com o teste do IKI, curiosamente com percentagens mais elevadas para a maioria das cultivares do que no Quadro III, com o pólen fresco. No teste do TTC não foram observados quaisquer grãos de pólen estéreis corados para nenhuma das polinizadoras. Nas Figuras 4 e 5 estão apresentados os grãos de pólen corados com os testes do IKI e TTC, respectivamente.

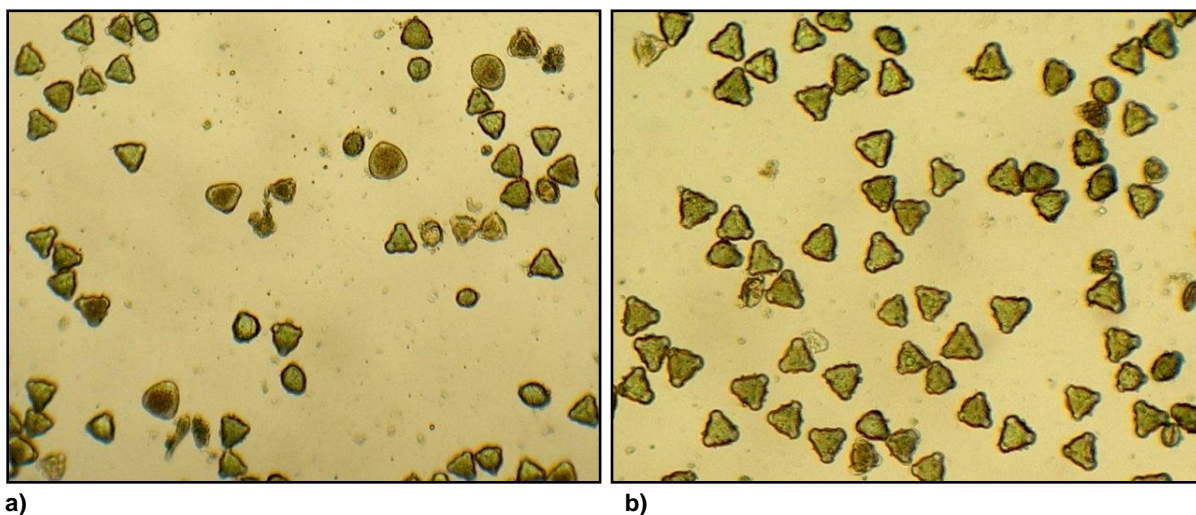
O teste do X-Gal não foi conclusivo em nenhuma das situações com o pólen estéril ou fresco. Como se pode observar na Figura 6, não foi possível distinguir com clareza quais os grãos que estavam realmente corados e quais os que não estavam. Esta situação ocorreu com todas as cultivares testadas.



**Figura 4** Grãos de pólen corados pelo teste do IKI (assinalados a encarnado) e não corados (assinalados a azul). a) Pólen fresco da cultivar Van. b) Pólen estéril da cultivar Van. Ampliação 100x.



**Figura 5** Grãos de pólen corados pelo teste do TTC (assinalados a encarnado) e não corados (assinalados a azul). a) Pólen fresco da cultivar De Saco do Douro. b) Pólen estéril da cultivar Van. Ampliação 100x.



**Figura 6** Coloração dos grãos de pólen depois de submetidos ao teste do X-Gal. a) Pólen fresco da cultivar De Saco do Douro. b) Pólen estéril da cultivar De Saco do Douro. Ampliação 100x.

No Quadro V estão indicados o número de vingamentos registados em cada árvore da cultivar De Saco do Douro, obtidos após o cruzamento controlado desta variedade com quatro cultivares polinizadoras. A taxa de vingamento total é a média das taxas de vingamento iniciais para cada polinizadora. Os resultados obtidos mostram que foi com a polinizadora 'Burlat' que se verificou o maior número de vingamentos por cada flor polinizada, ao passo que, com a polinizadora 'Bing' não foi obtido um único fruto vingado. O resultado do cruzamento que simula a auto-polinização registou quase 13% de vingamentos, mais do que o cruzamento com a polinizadora 'Van' que apenas resultou em 8% de frutos vingados. O segundo registo do número de vingamentos ocorreu 18 dias após o primeiro registo, tendo havido algumas quedas de frutos, nomeadamente nas árvores que foram polinizadas com pólen das cultivares De Saco do Douro e Burlat. A Figura 7 mostra o aspecto dos frutinhos vingados após a retirada dos sacos de algodão das árvores.

Quadro V – Taxa de vingamentos obtidos na cultivar De Saco do Douro após uma polinização controlada com o pólen das cultivares polinizadoras

Poliniza- dora	Código da De Saco do Douro	nº de flores polinizadas	1º registo do nº de vingamentos	2º registo do nº de vingamentos	Taxa de vingamento inicial	Taxa de vingamento final	% Total
Saco	C1	31	3	3	9,7%	9,7%	12,9%
	C2	31	5	3	16,1%	9,7%	
Van	C3	26	1	1	3,8%	3,8%	8,0%
	C4	24	3	3	12,5%	12,5%	
Burlat	SJ	31	10	8	32,3%	25,8%	25,4%
	S	28	5	5	17,9%	17,9%	
Bing	V	28	0	0	0,0%	0,0%	0,0%
	VV	32	0	0	0,0%	0,0%	





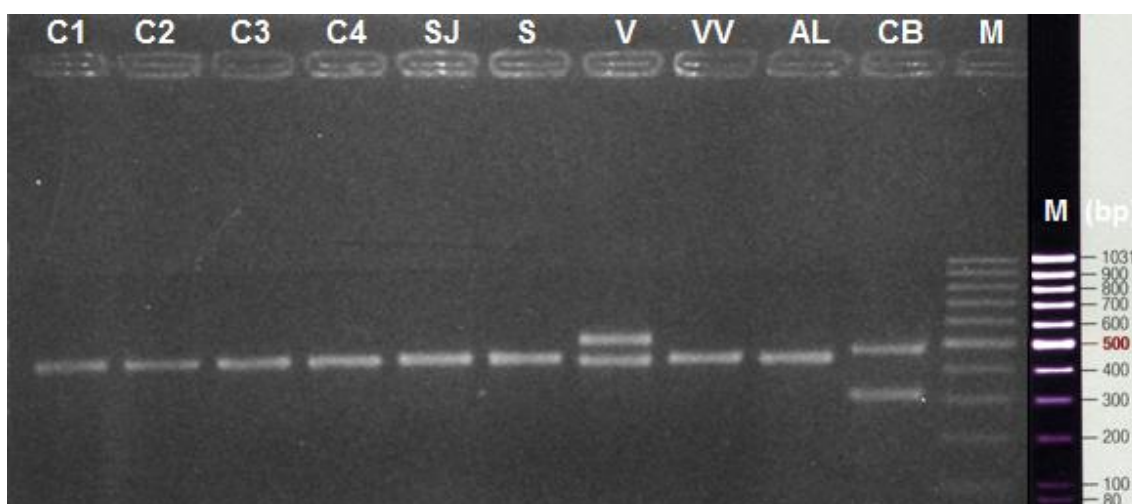
a)

b)

**Figura 7** a) e b) Frutinhas vingados resultantes da polinização da cultivar De Saco do Douro com o pólen da própria cultivar (auto-polinização).

- Identificação das sequências parciais de alelos S de cerejeiras.

As sequências parciais dos alelos S das cultivares de cerejeira 'De Saco' foram amplificadas a partir de DNA genómico, efectuando-se uma reacção de PCR com iniciadores específicos. Os fragmentos resultantes foram visualizados em gel de agarose após electroforese (Figura 8) seguindo-se a sua clonagem e sequenciação.



**Figura 8** Análise dos produtos de PCR obtidos por amplificação do DNA genómico dos oito genótipos utilizados no ensaio para a avaliação do vingamento, do genótipo AL e do genótipo CB, utilizando o par de iniciadores PaConsl. Os produtos de PCR foram visualizados num gel de 2% de agarose e corados com brometo de etídio. O marcador 100 bp Ladder foi usado como standard de DNA (M).

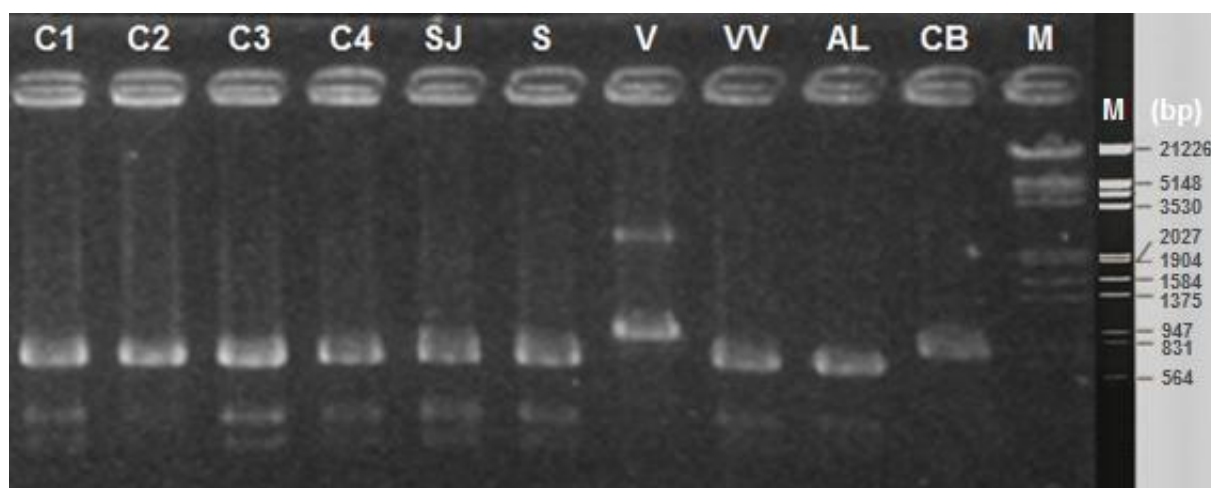
Dos nove genótipos alegadamente da cultivar De Saco do Douro, um dos genótipo (V) apresentou um padrão diferente, manifestando a presença de dois fragmentos com tamanhos distintos, o que não sucede com os restantes oito genótipos, que apenas exibiram uma banda com um peso molecular de cerca de 450 bp. Na cultivar De Saco da Cova da Beira também foi possível detectar a presença de duas bandas distintas com pesos moleculares diferentes entre si e diferentes dos apresentados pelo genótipo V.

No Quadro VI estão apresentados os vários genótipos e o peso molecular aproximado dos fragmentos de amplificação.

Quadro VI – Peso molecular aproximado dos fragmentos resultantes da amplificação por PCR, do DNA genómico dos oito genótipos utilizados no ensaio para a avaliação do vingamento, do genótipo AL e do genótipo CB, utilizando o par de iniciadores PaConsl.

Genótipos da De Saco	De Saco do Douro									De Saco da Cova da Beira
	C1	C2	C3	C4	SJ	S	V	VV	AL	CB
1º fragmento	450	450	450	450	450	450	550	450	450	500
2º fragmento							450			300

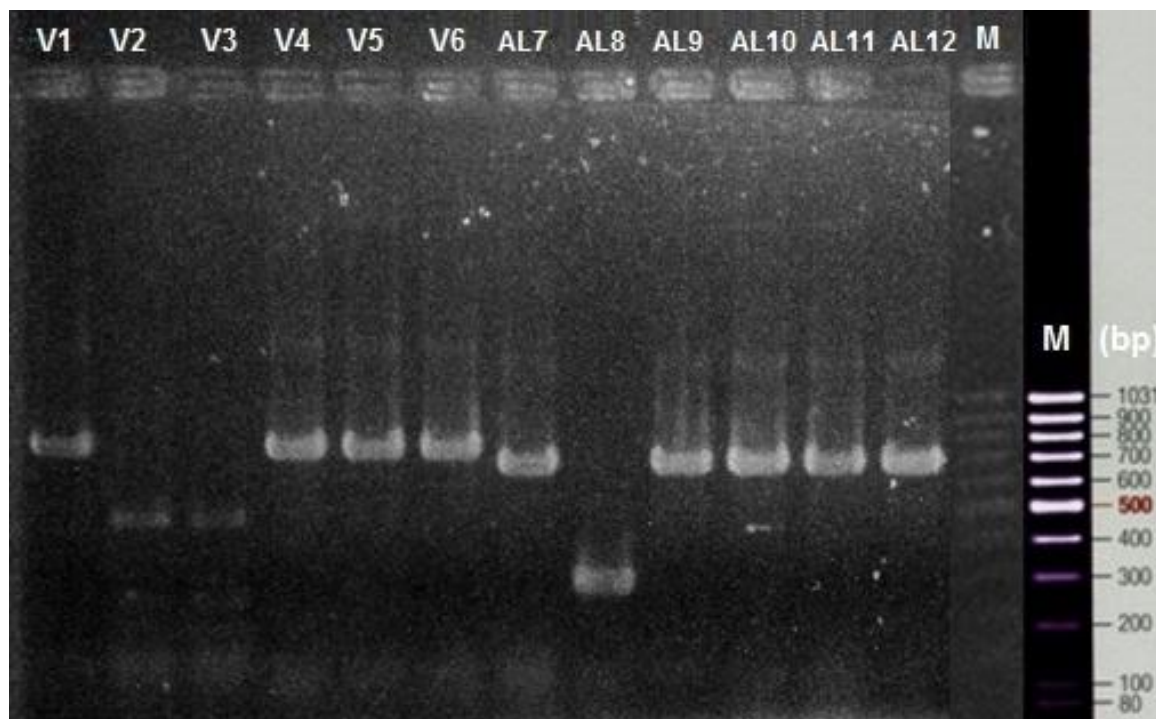
A visualização do gel de electroforese com as amostras resultantes da reacção de PCR utilizando o par de iniciadores PaConslI revelou também um padrão para os genótipos V e CB distintos do padrão obtido para os restantes genótipos (Figura 9).



**Figura 9** Análise dos produtos de PCR obtidos por amplificação do DNA genómico dos oito genótipos utilizados no ensaio para a avaliação do vingamento, do genótipo AL e do genótipo CB, utilizando o par de iniciadores PaConslI. Os produtos de PCR foram visualizados num gel de 2% de agarose e corados com brometo de etídio. O marcador  $\Lambda$  DNA HindIII/EcoRI foi usado como standard de DNA (M).

Na análise dos produtos de PCR utilizando o par de iniciadores PaConsII, todos os genótipos da 'De Saco do Douro' apresentaram uma banda com um peso molecular de aproximadamente 800 bp, excepto o genótipo V que apresentou duas bandas com cerca de 1000 e 2500 bp. O genótipo da 'De Saco da Cova da Beira' apresentou uma banda com um peso molecular de aproximadamente 900 bp.

Os fragmentos amplificados foram posteriormente isolados através da clonagem num plasmídeo pCR®II e inseridos em bactérias, e o DNA plasmídico extraído e amplificado através de PCR com iniciadores específicos do vector pCR®II. A visualização dos produtos amplificados após a electroforese permitiu a escolha de fragmentos distintos para sequenciação. Na Figura 10 é visível o resultado de um PCR obtido por amplificação do DNA plasmídico, após a clonagem dos fragmentos amplificados com os pares de iniciadores PaConsI. Do genótipo V escolhemos para sequenciar o V1 e o V4 pois estes dois produtos de PCR apresentam bandas com o tamanho esperado (cerca de 550 bp + 240 bp da sequência do vector). Do genótipo AL poderíamos sequenciar qualquer um dos produtos de PCR, com excepção ao AL8, cuja banda apresenta apenas os 240 bp do vector, não estando inserido o fragmento que codifica a S-RNase. Foram escolhidos o AL7 e AL12.



**Figura 10** Análise dos produtos de PCR obtidos por amplificação do DNA plasmídico, utilizando iniciadores específicos do vector pCR®II (T7 & M13). Os produtos de PCR foram visualizados num gel de 2% de agarose e corados com brometo de etídio. O marcador 100 bp Ladder foi usado como standard de DNA (M).

Dos genótipos referidos no Quadro VI apenas sequenciámos os fragmentos correspondentes aos genótipos SJ, V, AL e CB. Sequenciámos os produtos de amplificação da SJ por este genótipo ser referenciado como sendo da cultivar De Saco do Douro, tendo servido de padrão para todos os outros genótipos desta cultivar; o V foi sequenciado por ter apresentado um padrão diferente das outras ‘De Saco do Douro’; o AL foi sequenciado por ser da colecção da ex-ENFVN em Alcobaça e estar referenciado como sendo da cultivar De Saco do Douro; a CB foi sequenciada por ser da cultivar De Saco da Cova da Beira, não tendo sido utilizado nenhum clone de referência para esta cultivar por não existir na colecção da ex-ENFVN. As sequências correspondentes aos alelos S de cada genótipo, bem como as estimativas de localização dos intrões encontram-se no Anexo VII.

De forma a identificar os dois alelos, as sequências obtidas foram analisadas com o software *Chromas*, procedendo-se depois à sua análise com o programa *Blast* a fim de averiguar a existência de sequências homólogas em base de dados. Desta análise resultou a identificação de um só alelo para a ‘De Saco do Douro’, com elevada homologia com o alelo  $S_9$ , e a identificação de dois alelos para a ‘De Saco da Cova da Beira’, apresentando elevada homologia com os alelos  $S_3$  e  $S_5$ , como está indicado no Quadro VII. As homologias estão registadas nos Quadros VIII e IX. Da análise feita à sequência do genótipo V, resultou a identificação de dois alelos: um com elevada homologia com o  $S_{19}$  e outro com uma homologia não muito alta com o alelo  $S_4$  da espécie *Prunus webbii*.

Quadro VII – Alelos identificados por homologia das sequências obtidas por sequenciação dos vários genótipos, com sequências já existentes no GenBank

Genótipos	SJ	V	CB	AL
1º alelo	$S_9$	$S_{4Prw}$	$S_3$	$S_9$
2º alelo		$S_{19}$	$S_5$	

Nos Quadros VIII e IX, estão apresentadas as homologias dos fragmentos amplificados com os pares de iniciadores PaConsl e PaConslI, obtidas por comparação com sequências já armazenadas no GenBank. Não foram feitas mais nenhuma sequenciações dos fragmentos resultantes da amplificação com o par de iniciadores PaConslI por não trazerem significativo acréscimo de informação em relação ao par de iniciadores PaConsl.

Quadro VIII e IX – Homologia dos fragmentos amplificados com os pares de iniciadores PaConsl e PaConslI com sequências já armazenadas em base de dados.

Quadro VIII – Fragmentos amplificados com o par de iniciadores PaConsl

Cultivar	Genótipo	Fragmento	Tamanho do fragmento sequenciado (pb)	Homologia BLAST	Acesso	Probabilidade (e-value)
De Saco do Douro	SJ	S <sub>9</sub>	428	Prunus avium partial S-RNase gene for ribonuclease S9 precursor, exons 1-2, cultivar Inge, allele S9 (100% de similaridade)	<a href="#">AJ635271.1</a>	0,0
	AL	S <sub>9</sub>	428	Prunus avium partial S-RNase gene for ribonuclease S9 precursor, exons 1-2, cultivar Inge, allele S9 (100% de similaridade)	<a href="#">AJ635271.1</a>	0,0
De Saco da Cova da Beira	CB	S <sub>3</sub>	303	Prunus avium S3-RNase (S) gene, S3 allele, complete cds (97% de similaridade)	<a href="#">AY571663.1</a>	5,00E-146
		S <sub>5</sub>	462	Prunus avium cultivar Kronio ribonuclease S5 (S-RNase) gene, S-RNase-S5 allele, partial cds (98% de similaridade)	<a href="#">EU077235.1</a>	0,0
	V	S <sub>4Prw</sub>	502	Prunus webbii S4 S-RNase gene, partial cds (82% de similaridade)	<a href="#">DQ118146.1</a>	8,00E-132

Quadro IX – Fragmentos amplificados com o par de iniciadores PaConslI

Cultivar	Genótipo	Fragmento	Tamanho do fragmento sequenciado (pb)	Homologia BLAST	Acesso	Probabilidade (e-value)
De Saco do Douro	SJ	S <sub>9</sub>	798	Prunus avium partial S-RNase gene for ribonuclease S9, exons 2-3, cultivar Inge, allele S9 (100% de similaridade)	<a href="#">AJ635270.1</a>	0,0
	AL	S <sub>9</sub>	798	Prunus avium partial S-RNase gene for ribonuclease S9, exons 2-3, cultivar Inge, allele S9 (100% de similaridade)	<a href="#">AJ635270.1</a>	0,0
De Saco da Cova da Beira	CB	S <sub>3</sub>	897	Prunus avium S3-RNase (S) gene, S3 allele, complete cds (99% de similaridade)	<a href="#">AY571663.1</a>	0,0
	V	S <sub>19</sub>	986	Prunus avium ribonuclease S19-RNase (S-RNase) gene, S-RNase-S19 allele, exons 2, 3 and partial cds (100% de similaridade)	<a href="#">DQ336139.1</a>	0,0

Para o alelo S<sub>9</sub> fizemos uma reacção de amplificação com o par de iniciadores PaConsl-F + PaConslI-R e sequenciámos os fragmentos resultantes dessa reacção, a fim de identificar a



sequência de nucleótidos que está entre os dois pares de iniciadores (PaConsl e PaConslI). Como o número de nucleótidos entre cada par de iniciadores era reduzido (6 nucleótidos) não amplificámos os alelos  $S_3$  e  $S_5$  com o par de iniciadores PaConsl-F + PaConslI-R.

No Quadro X estão apresentados os alelos das três cultivares polinizadoras Burlat, Bing e Van e também os alelos das cultivares De Saco do Douro e De Saco da Cova da Beira por nós identificados. Estes resultados apontam para que a 'De Saco da Cova da Beira' seja semi-compatível com as cultivares Burlat, Bing e Van, pois ambas apresentam em comum o alelo  $S_3$ . A 'De Saco do Douro' deverá ser semi ou totalmente compatível com as cultivares Bing e Van, sendo no máximo semi-compatível com a cultivar Burlat, pois apresentam em comum o único alelo identificado na 'De Saco' duriense, o  $S_9$ .

Quadro X – Alelos de incompatibilidade gametofítica das cultivares polinizadoras e das duas cultivares 'De Saco'

Polinizadoras	Burlat	Bing	Van	De Saco do Douro	De Saco da Cova da Beira
1º alelo	$S_3$	$S_3$	$S_1$	$S_9$	$S_3$
2º alelo	$S_9$	$S_4$	$S_3$	-	$S_5$

## 5. Discussão

Teria sido mais adequado proceder primeiro à identificação dos alelos S das duas cultivares De Saco, e só depois à realização dos ensaios de campo para a determinação dos vingamentos, pois, com o conhecimento prévio do conteúdo alélico da cultivar De Saco do Douro, poderíamos escolher para a realização do ensaio de campo, apenas as cultivares polinizadoras geneticamente compatíveis com esta cultivar. No entanto isso não foi possível devido ao período limitado de que dispúnhamos, restringidos ao calendário escolar e ao próprio ciclo vegetativo da cerejeira.

Uma das razões para a escolha da cultivar De Saco do Douro para realizar o ensaio de campo em detrimento da 'De Saco da Cova da Beira', foi o facto de se conhecer tão pouco acerca desta cultivar duriense. O estabelecimento de um método para avaliar o vingamento desta cultivar em condições de campo pode contribuir para o inverter desta situação e a melhoria da fitotecnia desta cultivar. Apesar da 'De Saco da Cova da Beira' ter uma importância económica muito maior que a 'De Saco do Douro', foi importante o ensaio de campo ter incidido nesta última cultivar que, ao contrário da cultivar da Cova da Beira, não tinha ainda sido objecto de estudo em nenhum trabalho realizado até aos dias de hoje.

A metodologia de campo para acompanhar e avaliar o vingamento da cultivar de cerejeira 'De Saco do Douro' foi estabelecida com sucesso, pois foi possível delinear um plano que nas condições de campo e de forma expedita, permitiu o acompanhamento e avaliação do vingamento desta cultivar.

Os vingamentos resultantes dos cruzamentos controlados entre a cultivar De Saco do Douro e as quatro cultivares utilizadas como polinizadoras, foram baixos.

Segundo Santos (2008), um estudo efectuado por Rouvier (1990) mostrou que em condições manuais de polinização saturante (em que o factor quantidade de pólen não era um factor limitante), a taxa de vingamento para as cultivares 'Van' e 'Burlat' foi de 42% e de 28%, respectivamente. Embora estas sejam cultivares diferentes, podemos constatar que as taxas de vingamento observadas na cultivar De Saco, e obtidas igualmente em condições manuais de polinização saturante, foram de uma ordem de grandeza bastante inferior.

Nestas condições de polinização controlada, podemos identificar três factores que determinam o vingamento dos frutos: factor genético de incompatibilidade gametofítica entre cultivares, que irá ser abordado mais à frente; factor climático; e factor fisiológico, embora estes dois últimos factores estejam intimamente ligados.

Relativamente ao factor fisiológico, Bargioni (1996) cit in Santos (2008) refere a longevidade da viabilidade do óvulo e a velocidade de crescimento do tubo polínico, factores particularmente importantes na determinação do vingamento. Ambos os factores são

fortemente afectados pelas condições climáticas, sobretudo a temperatura. Observando o gráfico das temperaturas no mês de Abril da região de Vila Real, que serve de referência para Resende, podemos constatar que nos dois/três dias seguintes à polinização, que ocorreu dia 13, as temperaturas mínimas rondavam os 5-6°C, raramente passando dos 10°C, enquanto as temperaturas máximas situaram-se entre os 14-16°C, não indo além dos 20°C nos dias subsequentes. Com estas temperaturas, a germinação dos grãos de pólen, bem como o crescimento dos tubos polínicos poderão ter sido drasticamente afectados, podendo mesmo ter sido nulos com temperaturas de 5-6°C. Isto provocaria um atraso em todo o processo de fecundação, tendo como consequência a perda de viabilidade dos grãos de pólen e também a redução da longevidade da viabilidade dos óvulos.

Para além da temperatura, também a precipitação que ocorreu nos dias seguintes à polinização poderá igualmente ter afectado o vingamento, na medida em que a concentração de açúcares presentes no estigma, e que são essenciais à germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico, tenha sido reduzida pela água da chuva.

A viabilidade e o potencial de germinação dos pólenes utilizados na polinização controlada foram testados através de quatro métodos *in vitro*, para determinar a eficácia e aplicabilidade em condições de campo de cada um destes métodos. O objectivo era estabelecer um método expedito do ponto de vista agronómico e que pudesse ser aplicado facilmente em condições de campo, permitindo uma avaliação da qualidade relativa dos diferentes pólenes, mais do que estabelecer um método rigoroso do ponto de vista científico que determinasse a viabilidade/potencial de germinação de forma absoluta. Tendo em conta este propósito, foram escolhidos três procedimentos que envolveram a coloração dos grãos de pólen, e um procedimento envolvendo a germinação dos grãos de pólen em placas com gel de agar e sacarose.

Na germinação dos grãos de pólen *in vitro* podemos medir directamente a viabilidade do pólen observando se este germinou ou não, sendo por isso um método mais rigoroso. As percentagens de germinação dos grãos de pólen das diferentes cultivares polinizadoras foram extremamente baixas. De acordo com o trabalho realizado por Bolat & Pirlak (1999), as percentagens de germinação do pólen de quatro cultivares de cerejeira diferentes variaram entre 52 – 66 %, para uma concentração de sacarose de 15%, idêntica à utilizada nos nossos testes de germinação. Apesar de se tratar de cultivares diferentes, existe uma enorme discrepância entre os valores obtidos neste estudo e os valores apresentados por Bolat & Pirlak. Uma possível explicação para estes baixos valores de viabilidade do pólen, traduzidos por uma baixa percentagem de germinação, poderá ser a imaturidade do pólen recolhido das polinizadoras. De facto, as baixas temperaturas que se fizeram sentir no início do mês de Abril, aliado a alguma precipitação, poderão ter atrasado a maturação dos grãos

de pólen em dois ou três dias, baixando a percentagem de pólen viável na altura da polinização. Por outro lado, foi igualmente notória a dificuldade que tivemos em libertar os grãos de pólen das anteras aquando da sua recolha, o que mais uma vez poderá ser indicativo da falta de maturidade do pólen, que libertar-se-ia naturalmente de forma mais fácil se os grãos de pólen tivessem já atingido o estado maduro.

Embora a germinação dos grãos de pólen *in vitro* seja uma metodologia mais rigorosa, a sua aplicabilidade em condições de campo é dificultada pelas exigências ao nível da temperatura e da preparação do meio de germinação. Assim sendo, três outros procedimentos utilizando corantes vitais foram usados para testar igualmente a viabilidade do pólen.

Os resultados dos testes de coloração efectuados respectivamente no pólen fresco e no pólen estéril apresentam valores totalmente distintos. No teste do IKI, a percentagem de grãos de pólen corados situa-se por volta dos 20 – 30 % para as cultivares ‘Burlat’, ‘Van’ e ‘De Saco do Douro’, aumentando para cerca de 70 % na cultivar ‘Bing’. No entanto, quando observamos o resultado do mesmo teste efectuado ao pólen estéril, a percentagem de grãos de pólen corados é, no mínimo, surpreendente. Em todas as cultivares houve um aumento no número de grãos corados, excepto para a cultivar ‘Bing’ em que a percentagem baixou ligeiramente.

A conversão do açúcar em amido aquando da desidratação programada do pólen é uma indicação de que o pólen atingiu a maturidade estando apto para, após a absorção de água no estigma, dar início à germinação do tubo polínico e a fecundar a flor. O iodeto de potássio utilizado no teste de coloração do IKI irá muito provavelmente corar o amido que foi convertido, dando assim uma indicação da quantidade de pólen viável, apto a iniciar o processo de fecundação.

No entanto os resultados obtidos vêm pôr em causa a credibilidade deste teste, pois o iodeto de potássio corou indiscriminadamente tanto os grãos de pólen viáveis como os grãos de pólen esterilizados. Uma possível explicação para estes resultados advém do facto de o amido resultante da conversão do açúcar poder já estar presente nos grãos de pólen quando estes foram incubados a 80 °C durante duas horas. Neste processo de esterilização, o amido poderá não ter sido degradado, permanecendo presente tanto no pólen viável como no pólen esterilizado, sendo consequentemente corado pelo iodeto de potássio em ambos os casos.

No teste do X-Gal, foi impossível distinguir de forma criteriosa os grãos de pólen corados dos grãos de pólen não corados, estes apresentavam muitas vezes uma escala de cor azul com várias tonalidades, não sendo muitas vezes possível perceber até que ponto um grão de pólen estava ou não corado. Esta dificuldade tornou-se ainda mais evidente quando o

mesmo teste foi realizado com o pólen estéril, revelando resultados idênticos ao teste realizado com o pólen fresco, ou seja, colorações diferentes com várias tonalidades de azul. Em termos fisiológicos, o pólen viável produz  $\beta$ -galactosidase imediatamente após a divisão reducional da meiose (Firmage & Dafni, 2001), esta enzima é capaz de hidrolizar o X-Gal originando um composto de cor azul. Uma das possíveis explicações para a falta de nitidez da cor azul nos grãos de pólen realmente viáveis poderá ter a ver com a concentração inicial de X-Gal não ser suficientemente elevada para se notar a diferença da actuação da  $\beta$ -galactosidase presente nos grãos de pólen. Em todo o caso, este teste do X-Gal é dos três testes de coloração, aquele que é mais exigente em termos de temperatura (37 °C), pois a coloração azul é resultante da actuação de uma enzima que precisa desta temperatura para actuar, e por isso menos aplicável em condições de campo.

O teste do TTC, que indica a presença da dehidrogenase, foi dos três testes de coloração, aquele que apresentou resultados mais coerentes, não tendo aparecido nenhum grão de pólen corado no teste efectuado com o pólen estéril. Ainda assim, existiu uma grande variabilidade na percentagem de grãos corados entre as várias cultivares, variando de cerca de 5 % na 'Bing' e 'Burlat' até perto dos 50% na 'De Saco do Douro'. Por outro lado, estes valores ainda são relativamente baixos quando comparados com os obtidos por Bolat & Pirlak (1999), em que a percentagem de grãos corados pelo teste do TTC foi entre 67 e 81 % para as quatro cultivares de cerejeira utilizadas por estes dois autores.

Comparando os resultados entre a taxa de germinação e a percentagem de coloração dos grãos de pólen podemos constatar que os valores obtidos na germinação são sempre mais baixos que os valores obtidos no teste de coloração. Como a perda de viabilidade do pólen é um processo contínuo, que envolve a actividade de muitas enzimas, estas podem não perder a sua actividade todas ao mesmo tempo, sendo degradadas gradualmente a diferentes taxas.

Em muitos casos, o pólen poderá ainda ter enzimas activas (como por exemplo a  $\beta$ -galactosidase e a dehidrogenase) apesar de poder já ter perdido a capacidade de germinar, ou seja, os grãos de pólen podem ainda corar, devido à actividade destas enzimas, e no entanto já estarem inviáveis. Por isso, geralmente estes testes apresentam uma sobrestimação da viabilidade real do pólen, que deve ser tida em conta (Dafni & Firmage, 2000). No entanto, existem alguns valores muito discrepantes entre a taxa de germinação e a percentagem de grãos de pólen corados pelo TTC, como é o caso da 'Van' e sobretudo da 'De Saco do Douro' que apresentou uma percentagem de coloração 14 vezes superior à percentagem de germinação. Ainda assim, o teste do TTC foi aquele cujas percentagens de viabilidade mais se aproximaram dos valores das percentagens de germinação, sugerindo uma maior credibilidade. Por estas razões o TTC, que é um indicador da actividade da

enzima desidrogenase, revelou ser o corante mais adequado para, em condições de campo e de forma expedita, estimar e avaliar a viabilidade do pólen para estas cultivares de cerejeira.

Podemos ainda tentar estabelecer um paralelismo entre a percentagem de pólen viável e os resultados obtidos das polinizações cruzadas através da percentagem de vingamentos. A percentagem de vingamento mais baixa foi obtida nas 'De Saco do Douro' V e VV, cuja cultivar polinizadora foi a 'Bing', onde não houve sequer um único fruto vingado. Esta cultivar foi também aquela que apresentou uma menor percentagem de germinação, traduzindo-se por uma baixa percentagem de grãos de pólen viáveis, podendo ser esta uma das razões para o fraco vingamento. É, no entanto, necessário considerar que não só a capacidade de polinizar do pólen depende de várias condicionantes climáticas e fisiológicas, o mesmo acontece com a aptidão do pistilo para ser polinizado. Assim, o vingamento depende da viabilidade do pólen, da receptividade do estigma e qualidade dos óvulos, e das condições que as determinam, e ainda dos factores genéticos que determinam a (im)possibilidade de interacção entre as estruturas de reprodução feminina e masculina.

Para as outras polinizadoras esta relação entre a percentagem de viabilidade do pólen e a percentagem de frutos vingados não é tão evidente, sendo nestes casos os factores climáticos, fisiológicos e genéticos os que mais influência devem ter tido no vingamento dos frutos.

Em relação ao factor genético, é necessário considerar a presença nas Rosáceas do sistema de incompatibilidade gametofítica, o mecanismo que impede o cruzamento entre cultivares que possuam alelos de incompatibilidade (alelos S) idênticos, reduzindo consequentemente o número de vingamentos. Neste trabalho procedemos também à identificação dos alelos de incompatibilidade das duas cultivares de cerejeira 'De Saco'.

Nem todos os genótipos apresentaram o mesmo padrão nos tamanhos dos fragmentos quando amplificados com o mesmo par de iniciadores, indicando tratarem-se de cultivares distintas. A cultivar De Saco do Douro e a cultivar De Saco da Cova da Beira apresentaram no gel bandas de tamanhos totalmente diferentes, confirmando tratar-se de duas cultivares distintas. Depois dos fragmentos serem sequenciados, chegámos à conclusão por homologia com sequências já identificadas na base de dados, que a cultivar De Saco da Cova da Beira deverá possuir os alelos de incompatibilidade  $S_3$  e  $S_5$  e a cultivar De Saco do Douro deverá possuir o alelo  $S_9$ , não tendo sido possível identificar o segundo alelo com o método seguido neste trabalho. Os resultados obtidos para a cultivar presente na Ex-Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade em Alcobaça, exemplar da 'De Saco do Douro' corroboram que o genótipo SJ analisado seja um exemplar também desta cultivar,

pois o padrão de amplificação e as sequências obtidas são iguais. Além disso, um alinhamento feito entre o clone 'De Saco do Douro' da ex-ENFVN em Alcobaça (AL) e o clone 'De Saco do Douro' de Resende (SJ), que é considerado o clone de referência nesta região, revelou um emparelhamento perfeito entre os dois clones.

Dos oito clones presumivelmente da cultivar De Saco do Douro escolhidos para a realização do ensaio de campo, sabemos agora que um dos genótipos (V) não pertence nem à cultivar De Saco do Douro nem à cultivar De Saco da Cova da Beira. As bandas apresentadas no gel com os fragmentos resultantes da amplificação por PCR, utilizando os mesmos iniciadores, eram perfeitamente distintas de todas as outras. Após a sequenciação desses fragmentos e por homologia com sequências já armazenadas na base de dados, chegámos à conclusão que esta cultivar deverá possuir o alelo de incompatibilidade  $S_{19}$  tendo o segundo alelo uma homologia, ainda que não muito significativa, com o  $S_4$  da espécie *Prunus webbii*. Neste último alelo fez-se uma estimativa da localização do intrão por comparação com as posições dos intrões dos outros alelos estimados através do software *Netgene2*.

Dos oito genótipos que foram utilizados no ensaio de campo para avaliar e acompanhar o vingamento, apenas foram sequenciados dois: SJ e V. O genótipo da cerejeira SJ foi sequenciado por esta árvore ser considerada a nossa cultivar De Saco do Douro de referência na região de Resende; o genótipo da V também foi sequenciado, pois o padrão de amplificação observado após electroforese levantou dúvidas quanto à sua identidade. Apesar de ter revelado não ser nenhuma das duas cultivares De Saco, a cerejeira V apresentava características morfológicas e fisiológicas muito semelhantes à cultivar De Saco do Douro, mesmo as características do fruto eram idênticas à cereja desta cultivar, daí o ter sido escolhida como 'De Saco' para o ensaio da polinização. Já após os resultados laboratoriais se pôde constatar estar-se na presença de uma cultivar diferente. Outros dois genótipos sequenciados foram o CB e o AL. O CB foi sequenciado por ser o representante da cultivar De Saco da Cova da Beira. O AL foi sequenciado por ser a única cultivar De Saco presente na colecção da ex-ENFVN em Alcobaça, referenciado como representante da 'De Saco do Douro'.

Existe uma elevada homologia entre as sequências de nucleótidos por nós obtidas através de PCR com iniciadores específicos, e as sequências já existentes no GenBank correspondentes a cada um dos alelos de incompatibilidade. Para o alelo  $S_9$  a homologia é perfeita entre as duas sequências, sendo 100% idênticas. Já os alelos  $S_3$  e  $S_5$  embora apresentem uma elevada percentagem de homologia com as respectivas sequências da base de dados, o alinhamento não é perfeito. Estas pequenas diferenças entre as sequências que correspondem a cada alelo e as sequências armazenadas é devido, na

maior parte dos casos, à presença de nucleótidos degenerados nos iniciadores PaConsl-F&R e PaConslI-R em duas ou três posições.

A escolha dos pares de iniciadores PaConsl e PaConslI em detrimento de outros iniciadores já desenhados tem várias razões. Estes iniciadores foram desenhados por Sonneveld et al. em 2003, e pela sua eficácia têm sido muito utilizados desde então por outros autores. A variação no comprimento dos intrões e de várias regiões conservadas dos exões do  $S_1$  ao  $S_6$ , permitiu a estes autores desenhar iniciadores *consensus* que amplificavam regiões com os intrões incluídos para distinguir não só estes seis alelos, mas também para distinguir e identificar outros alelos.

O par PaConsl tem a grande vantagem de amplificar uma região do alelo que inclui o 1º intrão que apresenta um grande polimorfismo, e o PaConslI de amplificar uma região que inclui o 2º intrão que possui igualmente uma enorme variabilidade no seu comprimento. Assim, a probabilidade de detectar diferenças entre os alelos é maior, tendo sido esta a principal razão que nos levou à escolha destes pares de iniciadores.

Na cultivar De Saco da Cova da Beira foram identificados os dois alelos de incompatibilidade  $S_3$  e  $S_5$ , no entanto na cultivar De Saco do Douro apenas só foi possível identificar um dos dois alelos, o alelo  $S_9$ . Existem já referências onde apenas se identificou um só alelo, como é o caso de Ershadi & Moghdam, 2009. Na análise do produto de PCR da 'De Saco do Douro', podemos observar apenas o aparecimento de uma banda no gel de electroforese com cerca de 450 pb, ao passo que na 'De Saco da Cova da Beira' apareceram distintamente duas bandas com cerca de 300 e 500 bp. Também no genótipo V aparecem duas bandas com tamanhos diferentes. Duas hipóteses possíveis para o aparecimento de uma única banda no caso da 'De Saco do Douro' poderão ter sido: a reacção de PCR amplificou os dois alelos, mas estes por apresentarem tamanhos muito semelhantes, migraram juntos no gel de electroforese, ficando sobrepostos; ou a reacção de PCR só foi eficaz para um dos alelos ( $S_9$ ), não tendo sido possível amplificar o segundo alelo por os iniciadores não serem suficientemente específicos, não emparelhando bem com a sequência, ou pelas condições do PCR não se adequarem ao fragmento em questão.

Para tentar identificar o alelo desconhecido da 'De Saco do Douro' e verificar se na banda observada se acumulava um ou dois produtos, foi utilizado um novo par de iniciadores (Pru-T2 & Sl-32), em que o segundo iniciador hibrida numa zona do segundo intrão. A hibridação nesta zona, que apresenta uma grande variabilidade, poderia originar uma amplificação diferencial, que nos permitisse, após sequenciação, identificar o outro alelo da 'De Saco do Douro'. Este par de iniciadores tem sido também bastante utilizado por outros autores em trabalhos já publicados. Wunsch & Hormaza (2004a, b), utilizaram esta combinação de iniciadores com sucesso na determinação de um alelo presente em cultivares de cerejeiras



espanholas, que não estavam inicialmente a conseguir identificar. Infelizmente, também estes iniciadores não conduziram a grande sucesso na identificação do segundo alelo da 'De Saco do Douro'.

Numa outra tentativa de identificar o alelo desconhecido da 'De Saco do Douro', foram utilizadas as enzimas Mbol e SacI numa reacção de digestão enzimática. A escolha destas enzimas foi feita utilizando o software *NEB Cutter*, procurando-se as enzimas que possuíam locais de restrição distintos nas sequências nucleotídicas de quatro alelos S diferentes obtidos na base de dados. Foram seleccionados os alelos S cujos tamanhos esperados dos fragmentos resultantes da amplificação com os iniciadores PaConsl e PaConslI apresentavam tamanhos muito próximos ao  $S_9$  ( $S_1$ ,  $S_{10}$  e  $S_{14}$ ), assumindo a hipótese de que fragmentos amplificados diferentes, mas tendo tamanhos semelhantes, migrarem juntos. Foram inicialmente escolhidas cinco enzimas (MaeII, Mbol, PstI, SacI e TaqI), que apresentavam locais de restrição nas sequências nucleotídicas dos quatro alelos S; destas cinco enzimas, escolhemos a Mbol e a SacI após termos analisado o tamanho esperado dos fragmentos cortados por cada enzima, pois apenas estas permitiam distinguir os quatro alelos S entre si, ao apresentarem os fragmentos cortados com tamanhos esperados diferentes.

No entanto, mais uma vez não foram observadas diferenças no gel da electroforese, entre os vários fragmentos resultantes da digestão enzimática do DNA da 'De Saco do Douro', utilizando estas enzimas. Este resultado sugere que só se amplificou um fragmento.

Após a identificação dos alelos das duas cultivares 'De Saco', e conhecendo já os alelos de incompatibilidade das cultivares polinizadoras, podemos novamente fazer uma interpretação dos resultados obtidos no ensaio de campo agora que o factor genético já é conhecido. O cruzamento que resultou no maior número de frutos vingados (25,4 %) foi aquele em que a 'Burlat' foi a cultivar polinizadora. Embora não sabendo qual é o outro alelo da cultivar De Saco do Douro, sabemos que pelo menos partilha um alelo em comum com a 'Burlat', o alelo  $S_9$ , o que faz com que estas duas cultivares sejam no máximo semi-compatíveis.

Estes resultados podem parecer um pouco contraditórios, sobretudo quando verificamos que o cruzamento que resultou no segundo maior número de frutos vingados (12,9 %) foi aquele que pretendeu simular o auto-cruzamento, utilizando o pólen da própria 'De Saco do Douro'. Naturalmente que este tipo de ensaios não são totalmente credíveis, aliás têm mesmo vindo a perder alguma importância quando se pretende estudar a incompatibilidade genética entre cultivares de cerejeira, porque são de facto muitos os factores que interferem com os ensaios de campo, a começar por exemplo pelas características e localizações de cada árvore.

As oito árvores escolhidas como sendo 'De Saco do Douro' para a realização deste ensaio, estão distribuídas por cinco localizações diferentes. Esta dispersão prende-se com o reduzido número de indivíduos desta cultivar tradicional na região, que tem perdido o seu interesse comercial para cultivares estrangeiras comercialmente mais interessantes, embora nos últimos anos se tenha notado um renovado interesse por esta cultivar de cerejas muito apreciadas pela qualidade e doçura do seu fruto. Esta dispersão, se por um lado permite ter uma amostragem significativa das condições da região para a cultura da cerejeira, por outro lado, leva a uma grande heterogeneidade das condições que daí advêm, que é prejudicial para os ensaios de campo e para o estabelecimento de critérios na interpretação dos resultados.

Assim temos árvores localizadas a diferentes cotas de altitude, umas estão mais próximas do rio Douro, em que as amplitudes térmicas dia-noite são provavelmente menores do que as que se fazem sentir a cotas mais elevadas onde se localizam outras árvores; há árvores que estão situadas num vale, e por isso estão provavelmente mais resguardadas do frio, da chuva, do vento, etc, ao passo que outras estão situadas em encostas mais expostas às intempéries.

Também nem todas as árvores têm a mesma idade, sendo que três delas não entraram sequer em plena produção, o que em termos fisiológicos poderá implicar que nem todos os fotoassimilados vão para a formação e crescimento e dos frutos, havendo uma parte considerável dos compostos resultantes da fotossíntese que serão investidas na parte vegetativa da árvore, podendo provocar um desequilíbrio nutricional que poderá afectar os vingamentos.

É importante escolher árvores sãs, isentas de doenças e pragas, nomeadamente formigas que ao alimentarem-se dos nectários das flores podem provocar a dessecação do estigma, interferindo com a polinização e consequentemente afectar o vingamento. Os insectos encontrados nos sacos de algodão (*Forficula auricularia*) parecem, porém, não ter interferido com os vingamentos, pois eram em pequeno número e apenas se encontraram em duas ou três árvores, situados nas pregas dos sacos de algodão onde depositavam os ovos.

Outros dos factores que podem interferir com os resultados dos ensaios são as limitações que o próprio ensaio apresenta. O sistema montado não é absolutamente estanque, podendo haver grãos de pólen de outras variedades, que por qualquer razão consigam passar a barreira de protecção do saco e fecundar a flor. A colocação do saco de algodão é um dos momentos críticos do ensaio: entre o final da emasculação de uma flor até à colocação do saco, há um período mínimo de tempo (2-3 minutos) em que o estigma da flor fica exposto ao ar, havendo uma probabilidade, ainda que baixa, de nesse período de tempo haver um grão de pólen em suspensão no ar, que alcance o estigma da flor e a consiga

fecundar. Outro período crítico é também a polinização, por um lado porque temos de retirar o saco da flor, pelo menos parcialmente, para podermos polinizar eficazmente, ocorrendo a possibilidade de surgir a mesma situação anteriormente descrita. Por outro lado, a própria polinização é uma operação algo complicada, pois a colocação do pólen deve ser efectuada com uma só passagem do pincel, para evitar que seja colocado pólen em excesso que provoque a dessecação do estigma da flor, acabando por secar todo o pistilo. Ao mesmo tempo, devemos certificarmo-nos de que a passagem que fizemos com o pincel, coloca o pólen suficiente no estigma da flor para que a polinização seja eficaz.

As árvores que foram polinizadas pela 'Burlat' eram árvores com seguramente mais de dez anos de idade e ambas situadas em locais resguardados, sendo que uma delas (a SJ) se encontrava a uma baixa cota de altitude muito próxima do rio, traduzindo-se no dobro dos vingamentos dos obtidos na árvore S, também polinizada pela 'Burlat'. Devido a umas condições mais propícias ao vingamento, e apesar da semi-incompatibilidade que a 'De Saco do Douro' tem em relação à cultivar Burlat, estes cruzamentos obtiveram melhores resultados.

Em relação ao ensaio de auto-cruzamento, no qual resultou quase 13% de frutos vingados, podemos referir ainda um outro aspecto, que a par das limitações inerentes aos ensaios de campo e de um muito provável mau isolamento dos sacos de algodão, podem ter conduzido a estes resultados.

Dentro da família das Rosáceas, as árvores da espécie *Prunus avium* são aquelas em que o sistema de incompatibilidade gametofítica se expressa com maior evidência, ao contrário por exemplo das pereiras ou pessegueiros que também apresentam auto-incompatibilidade mas que nestas espécies é muito menos marcado, sendo por isso de estranhar os vingamentos obtidos na auto-polinização da 'De Saco do Douro'. No entanto, o GSI é um mecanismo que poderá apresentar falhas em determinadas condições, nem sempre funcionando a 100%. A actividade da S-RNase também é afectada por diversos factores nomeadamente a temperatura. Sendo a S-RNase uma enzima, poderá ter ocorrido que a sua actividade tenha sido de alguma forma afectada, e a sua acção não tenha sido 100% eficaz em impedir que as proteínas responsáveis pelo crescimento do tubo polínico tivessem sido traduzidas e sintetizadas, como refere Goldway *et al.*, 2007.

Por outro lado o período de actuação da S-RNase pode não ter coincidido exactamente com a maturação do grão de pólen, podendo ter ocorrido uma de duas situações: o grão de pólen já estar maduro aquando da polinização e a sua germinação começar antes de a própria flor ter sintetizado a sua S-RNase, ou pelo contrário o pólen não estava ainda suficientemente maduro aquando da polinização, germinando só mais tarde quando a actividade da enzima já tinha cessado. Em ambos os casos, o sistema de incompatibilidade, que impede o

cruzamento entre cultivares que possuam os mesmos alelos S, teria sido ultrapassado, justificando assim o aparecimento de frutos vingados resultantes do auto-cruzamento de uma cultivar auto-incompatível, em que os alelos S do pólen são idênticos aos alelos S do pistilo da flor.

Um outro resultado dos ensaios de campo que pode também causar alguma surpresa é a total ausência de frutos vingados no cruzamento entre a cultivar Bing e a De Saco do Douro. Uma das duas árvores utilizadas no ensaio (árvore V), que julgávamos inicialmente tratar-se de uma árvore da cultivar De Saco do Douro, não pertence a esta variedade como foi referido anteriormente, pelo que não iremos fazer considerações a seu respeito. A outra árvore, também polinizada pela cultivar Bing, é a De Saco do Douro que se encontra a maior cota de altitude, e talvez aquela que mais exposta esteja ao frio e ao vento. Estes factos, juntamente com um provável atraso fenológico na maturação das flores em relação aos outros clones da 'De Saco do Douro', podem ter contribuído de forma decisiva para o insucesso no vingamento dos frutos, pois a nível genético as cultivares não são, pelo menos totalmente, incompatíveis.

Do ponto de vista agronómico, este trabalho vai permitir aos fruticultores de cerejeiras das cultivares De Saco da Cova da Beira e De Saco do Douro plantar os seus pomares considerando já quais as melhores variedades polinizadoras a incluir nas suas plantações. A inclusão de cerejeiras que forneçam pólen totalmente compatível a um pomar constituído apenas por cultivares auto-incompatíveis é extremamente importante para, mesmo em condições adversas de polinização, poder aumentar o vingamento e o potencial produtivo do pomar. Polinizadoras totalmente compatíveis representam uma fonte de pólen, em que a incompatibilidade genética não é um factor limitante no vingamento do fruto.

Para a Cova da Beira o conhecimento dos alelos da sua 'De Saco' é total, por isso a escolha de polinizadoras tem de ser feita fora do seu grupo de incompatibilidade, tendo sempre em consideração a coincidência dos períodos de floração e as características agronómicas ou comerciais de interesse. Por exemplo, a cultivar Blackbourne Black e a cultivar Hedelfinger, variedades de cerejeira cada vez mais plantadas na Cova da Beira, sobretudo a 'Hedelfinger', são cultivares que não seriam boas polinizadoras pois, independentemente de terem um período de floração coincidente ou não com a 'De Saco', ambas possuem o par de alelos  $S_3$  e  $S_5$  idêntico aos presentes na 'De Saco da Cova da Beira', sendo por isso cultivares totalmente incompatíveis. Para a região de Resende, o contributo deste trabalho não é tão significativo, pois apenas um alelo foi identificado na 'De Saco do Douro'. Em todo o caso, aquilo que foi dito em relação à escolha das cultivares polinizadoras para a 'De Saco da Cova da Beira', aplica-se também para a 'De Saco do Douro', devendo evitar-se escolher cultivares que possuam o alelo  $S_9$ .

Estudos futuros devem ser feitos para conseguir identificar o segundo alelo da cultivar De Saco do Douro. A digestão enzimática dos fragmentos amplificados por PCR utilizando outras enzimas de restrição, poderá ser uma boa estratégia para alcançar esse objectivo. Uma outra metodologia que pode ser seguida é tentar isolar as proteínas S-RNases, ou utilizar um gel de alta resolução na electroforese de modo a separar os dois alelos, caso tenham pesos moleculares muito próximos. Outra forma mais tradicional é o recurso aos cruzamentos controlados em campo. Embora apresente limitações, estes ensaios podem ser uma importante ferramenta quando se pretende abordar o problema dos baixos vingamentos numa perspectiva holística, incluindo todos os aspectos de ordem climática, fisiológica e genética não de forma separada e estanque, mas de forma global estudando as interligações e as relações existentes entre cada aspecto. Por último, o desenvolvimento de novos iniciadores ou a utilização de outros já existentes, pode também contribuir para a identificação do outro alelo.

## 6. Conclusões

Este trabalho teve como objectivos a identificação dos alelos S responsáveis pelo controlo do mecanismo de auto-incompatibilidade gametofítica nas cultivares de cerejeira ‘De Saco da Cova da Beira’ e ‘De Saco do Douro’, e também o estabelecimento de um método de avaliação do seu vingamento em condições de campo.

Os ensaios de campo efectuados para avaliar o vingamento da ‘De Saco do Douro’ em condições de campo foram realizados de forma expedita e objectiva, tendo-se conseguido adoptar métodos que estavam descritos na literatura, e que foram realizados em condições de campo apoiados por alguns equipamentos não demasiado sofisticados, que devem existir num laboratório comum numa zona agrícola ou de uma escola.

Dos quatro métodos aplicados, três deles envolviam a coloração dos grãos de pólen viáveis com três corantes (IKI, TTC e X-Gal) o outro método envolvia a germinação dos grãos de pólen em placas com gel de agar e sacarose. Tanto os testes de coloração, como os testes de germinação dos grãos de pólen das quatro polinizadoras revelaram percentagens muito baixas de viabilidade e de germinação, respectivamente. De facto, as condições climáticas que se fizeram sentir, poderão ter atrasado a maturação dos grãos de pólen em dois ou três dias, diminuindo estes valores de viabilidade e germinação. Chegámos também à conclusão que dos três testes de coloração utilizados (IKI, TTC e X-Gal), aquele que apresentou resultados mais coerentes, foi o teste do TTC, que foi o teste com o menor número de falsos positivos, não tendo aparecido nenhum grão de pólen corado no teste efectuado com o pólen estéril; além disso, este método, utilizando este corante, revelou ser um método rápido, simples e objectivo para fazer uma avaliação da viabilidade dos grãos de pólen em condições de campo.

Confirmando as nossas expectativas após a análise dos testes de germinação e coloração, o número de frutos vingados resultantes da polinização controlada entre a ‘De Saco do Douro’ e as quatro polinizadoras (incluindo a própria ‘De Saco’) foi baixo. Apesar disso os ensaios revelaram que a cultivar Burlat foi a polinizadora que proporcionou um maior número de vingamentos (25,4 %) na ‘De Saco do Douro’. As baixas percentagens de vingamento poderão em grande medida ter ficado a dever-se às condições climáticas adversas aquando da polinização e nos dias seguintes, em que as baixas temperaturas que se fizeram sentir no início do mês de Abril, aliado a alguma precipitação impossibilitaram a germinação dos grãos de pólen e o bom desenvolvimento dos tubos polínicos.

A dessecação do pistilo, devido a excessos de passagem com o pincel no estigma da flor aquando da polinização, ou devido a uma maior exposição do pistilo aos elementos por estar mais desprotegido devido à flor ter sido emasculada, poderá igualmente ser um factor

que tenha contribuído para o baixo vingamento. Também a falta de maturidade dos grãos de pólen poderá estar na origem do reduzido número de frutos vingados, conclusão a que chegámos após termos feito os testes de germinação e coloração dos grãos de pólen, estes realizados já sob condições controladas de temperatura e humidade.

Foram identificados alelos S de incompatibilidade gametofítica nas duas cultivares de cerejeira De Saco da Cova da Beira e De Saco do Douro. Na 'De Saco da Cova da Beira' foram identificados os alelos S<sub>3</sub> e S<sub>5</sub> e na cultivar De Saco do Douro apenas foi identificado o S<sub>9</sub>.

Estes alelos foram identificados utilizando métodos moleculares já estabelecidos para outras cultivares de cerejeira. Estes métodos permitem a utilização de pequenas quantidades de material vegetal, para de forma rápida e expedita obter resultados fiáveis.

O processo de extracção do DNA genómico a partir de folhas jovens das duas cultivares De Saco, segundo o método de Doyle e Doyle (1990), foi simples e bastante eficaz.

Os iniciadores utilizados na amplificação por PCR das sequências nucleotídicas que codificam as S-RNases, o par PaConsl e o par PaConslI, foram bastante eficazes, pois foi possível amplificar as sequências parciais de três alelos das cultivares 'De Saco' e ainda os dois alelos S do genótipo V, um genótipo que inicialmente fora considerado como 'De Saco do Douro' mas que o decorrer do trabalho experimental viria a evidenciar não ser. No entanto não foi possível, com estes pares de iniciadores, identificar o segundo alelo da 'De Saco do Douro'.

Várias foram as metodologias aplicadas na tentativa de identificar este alelo desconhecido, como o recurso a reacções de digestão enzimática com as enzimas de restrição MboI e SacI, como também a utilização dos iniciadores Pru-T2 & SI-32 na reacção de amplificação por PCR. Em nenhum dos casos se visualizaram padrões de bandas diferentes no gel de electroforese, não tendo sido possível a identificação do segundo alelo da 'De Saco do Douro', pois as enzimas de restrição escolhidas, e os outros iniciadores utilizados também não conduziram a resultados conclusivos.

A análise conjunta dos resultados dos vingamentos e da identificação dos alelos da 'De Saco do Douro', sugere que o sistema de incompatibilidade gametofítica nesta cultivar não será 100% eficaz, devendo a enzima S-RNase ter um período limitado de actuação e ser afectada por factores climáticos como a temperatura. Fora do seu período de actuação (fase em que o pistilo está maduro) e/ou sob condições adversas, a acção da enzima S-RNase poderá ser menos eficaz, permitindo que o cruzamento entre cultivares geneticamente incompatíveis origine frutos, como sucedeu no caso da auto-polinização da 'De Saco do Douro'. Na cerejeira a auto-incompatibilidade gametofítica está fortemente marcada, por isso, também não é de excluir a hipótese de que o isolamento dos sacos não tenha sido

perfeita e o pólen que deu origem aos vingamentos seja proveniente de outras cultivares. Para averiguar esta situação teríamos de analisar o conteúdo alélico da descendência.

Do ponto de vista agronómico podemos concluir que a utilização de cultivares polinizadoras compatíveis nem sempre é o garante para a obtenção de bons vingamentos. No entanto, o conhecimento dos alelos das duas cultivares De Saco poderá ser muito importante para os fruticultores destas cerejeiras na tomada de decisão em relação às cultivares polinizadoras que devem ser incluídas no pomar, pois irá permitir a utilização de polinizadoras geneticamente compatíveis com as cultivares De Saco, aumentando o seu potencial produtivo.

Em condições óptimas talvez seja suficiente para a polinização da 'De Saco da Cova da Beira' a utilização de uma cultivar semi-compatível ( $S_3S_x$  ou  $S_5S_x$ ), em condições sub-óptimas talvez seja melhor optar por uma totalmente compatível (que não apresente nem o  $S_3$ , nem o  $S_5$ ). Em relação à 'De Saco do Douro' deverá optar-se por cultivares que não tenham o  $S_9$ . No entanto, podemos também concluir que independentemente das cultivares serem ou não geneticamente compatíveis, os factores de ordem climática relacionados com a fisiologia da própria planta são preponderantes para um bom vingamento do fruto e, em último caso, para a obtenção de boas produtividades.



## Referências Bibliográficas

Anónimo; 2007. Diagnóstico sectorial da cereja; Gabinete de planeamento e políticas; Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. 15pp

Bolat, I.; Pirlak, L.; 1999. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some Stone fruits; *Tr. J. of Agriculture and Forestry*. 23, 383 - 388.

Bots, M.; Mariani, C.; 2005. Pollen viability in the field. Radboud Universiteit Nijmegen. 52pp

Carvalho, M. L.; 1994. Caracterização do pomar de cerejeira na Cova da Beira. Modelação da fenologia da cerejeira (*Prunus avium*). Tese de mestrado em Produção Vegetal. Instituto Superior de Agronomia Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 106pp.

Choi, C.; Tao, R.; Andersen, R. L.; 2002. Identification of self-incompatibility alleles and pollen incompatibility groups in sweet cherry by PCR based s-allele typing and controlled pollination.; *Euphytica*. 123: 1, 9 - 20.

Costa, F.; 2006. Avaliação das características agronómicas da cerejeira 'De Saco' na região da Cova da Beira; Tese de mestrado em Agricultura e Horticultura Sustentáveis. Instituto Superior de Agronomia Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 98pp

Dafni, A.; Firmage, D.; 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution*. 222: 113 – 132

Doyle, J. I.; Doyle, J. L.; 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13 – 15.

Ershadi, A.; Moghadam, E. H.; 2009. Identification of S-Alleles in 25 Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Cultivars by Allele-Specific PCR Amplification. *Acta Horticulturae* 814: 619 – 622.

Firmage, D.H.; Dafni, A.; 2001. Field tests for pollen viability; a comparative approach. *Acta Horticulturae* 561: 87 – 94.

- Gisbert, A. D.; Badenes, M. L.; Tobutt, K. R.; Llacer, G.; Romero, C.; 2008. Determination of the S-allele composition of sweet cherry ( *Prunus avium* L.) cultivars grown in the southeast of Spain by PCR analysis.; *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 83: 2, 246-252.
- Goldway, M.; Sapir, G.; Stern, R. A.; 2007. Molecular basis and Horticultural application of the gametophytic self-incompatibility system in rosaceous tree fruits. *Plant Breeding Reviews*, 28: 215 – 237.
- Ma, R. C.; Oliveira, M.M.; 2002. Evolutionary analysis of S-RNase genes from Rosaceae species; *Mol Genet Genomics*. 267: 71 – 78
- Mota, M.; Oliveira, C.M.; 2005. Identificação de alelos S na pereira 'Rocha' e determinação da compatibilidade entre cultivares. *Actas Portuguesas de Horticultura* 6: 232 - 238.
- Mota, M.; Tavares, L.; Oliveira, CM.; 2009. Identificação de alelos S em diferentes cultivares de pereira presentes nos pomares do Oeste e avaliação da compatibilidade gametofítica com a 'Rocha'. *Actas Portuguesas de Horticultura* 11: 29 - 35
- Newbigin, E.; Uyenoyama, M. K.; 2005. The evolutionary dynamics of self-incompatibility systems. *Trends in genetics*. Vol. 21 No. 9.
- Pirlak, L.; Güleriyüz, M.; 2005. Determination of pollen quality and quantity in cornelian cherry (*cornus mass* l.). *Bangladesh J. Bot.* (1): 1 - 6.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.; 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1: 1.25 – 1.28.
- Santos, A.; Gonçalves, B.; Santos-Ribeiro, R.; 2008. Morfologia e fisiologia do crescimento e reprodução. In *Cerejeiras – A Árvore e o Fruto*; Ed. Santos, A. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 343pp.
- Schuster, M.; Flachowsky, H.; Kohler, D.; 2007. Determination of self-incompatible genotypes in sweet cherry ( *Prunus avium* L.) accessions and cultivars of the German Fruit Gene Bank and from private collections.; *Plant Breeding*. 126: 5, 533 - 540.

Sonneveld T.; Tobutt K. R.; Robbins T. P.; (2003). Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers; *Theoretical and Applied Genetics*. 107: 1059 – 1070.

Sonneveld, T.; Robbins, T. P.; Boskovic, R.; Tobutt, K. R.; 2001. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection.; *Theoretical and Applied Genetics*. 102: 6/7, 1046 – 1055.

Tavares, L.; 2006. Caracterização molecular de alelos S em pereira 'Rocha'.; Relatório do Trabalho de Final de Curso de Engenharia Agronómica. Instituto Superior de Agronomia Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa. 38pp.

Vaughan, S. P.; Boskovic, R. I.; Gisbert-Climent, A.; Russell, K.; Tobutt, K. R.; 2008. Characterisation of novel S-alleles from cherry (*Prunus avium* L.); *Tree Genetics and Genomes*. 4: 3, 531 - 541.

Wang HongXia; Zhang KaiChun; Su HuaiRui; Naihaoye; 2010. Identification of the S-genotypes of several sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars by AS-PCR and pollination; *African Journal of Agricultural Research*. 5: 3, 250 - 256.

Wiersma, P. A.; Wu, Z.; Zhou, L.; Hampson, C.; Kappel, F.; 2001. Identification of new self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) and clarification of incompatibility groups by PCR and sequencing analysis.; *Theoretical and Applied Genetics*. 102: 5, 700 - 708.

Wunsch, A.; Hormaza, J. I.; 2004a. Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.); *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 299 – 305.

Wunsch, A.; Hormaza, J. I.; 2004b. Molecular evaluation of genetic diversity and S -allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars.; *Genetic Resources and Crop Evolution*. 51: 6, 635 - 641.

Foram também consultados os Sites:

- <http://faostat.fao.org/default.aspx>  
Consultado em 13 de Agosto de 2010
- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>  
Consultado em 26 de Agosto de 2010
- <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>  
Consultado em 26 de Agosto de 2010
- <http://www.bioinformatics.org/sms2/>  
Consultado em 26 de Agosto de 2010
- <http://www.restrictionmapper.org/>  
Consultado em 5 de Julho de 2010
- <http://www.cm-resende.pt/files/34/3496.pdf>  
Consultado em Agosto de 2010
- <http://www.meteo.pt/pt/oclima/acompanhamento/>  
Consultado em Agosto de 2010

---

# Anexos

## Anexo I – Dados estatísticos sobre a produção de cerejas em Portugal e no Mundo

Quadro A1 – Dados estatísticos de produção, área cultivada e produtividade da cultura da cerejeira em 2008 nos 30 maiores países produtores de cereja do mundo, na UE (27) e no mundo (FAOSTAT).

Cerejas 2008	Produção (t)	Área Cultivada (ha)	Produtividade (t/ha)
Mundo	1802231	350157	5,15
UE (27)	489753	125179	3,91
Turquia	338361	35800	9,45
Estados Unidos da América	225073	33431	6,73
Irão	198768	28176	7,05
Itália	134407	28900	4,65
Ucrânia	74700	12600	5,93
Roménia	67664	7628	8,87
Federação Russa	63000	18000	3,50
Espanha	62900	24671	2,55
Uzbequistão	61000	7000	8,71
Chile	60000	12969	4,63
República Árabe da Síria	48300	12700	3,80
Grécia	42000	10000	4,20
Polónia	40818	9903	4,12
França	39576	10752	3,68
Líbano	30000	8100	3,70
Sérvia	29551	9000	3,28
Áustria	26790	2400	11,16
Alemanha	25166	5449	4,62
China	25000	6000	4,17
Bulgária	16067	11800	1,36
Japão	16600	4490	3,70
Arménia	12000	1400	8,57
Portugal	<b>10528</b>	<b>6255</b>	<b>1,68</b>
Bósnia e Herzegovina	10089	5500	1,83
Cazaquistão	9890	1700	5,82
Austrália	9730	1800	5,41
Croácia	8009	3100	2,58
Índia	8000	1700	4,71
Albânia	8000	1500	5,33
Hungria	7744	1795	4,31

Quadro A2 – Dados estatísticos de produção, área cultivada e produtividade da cultura da cerejeira em 2008 nos 27 países da União Europeia (FAOSTAT).

<b>Cerejas 2008</b>	<b>Produção (t)</b>	<b>Área Cultivada (ha)</b>	<b>Produtividade (t/ha)</b>
<b>Mundo</b>	1802231	350157	5,15
<b>UE (27)</b>	489753	125179	3,91
<b>Itália</b>	134407	28900	4,65
<b>Roménia</b>	67664	7628	8,87
<b>Espanha</b>	62900	24671	2,55
<b>Grécia</b>	42000	10000	4,20
<b>Polónia</b>	40818	9903	4,12
<b>França</b>	39576	10752	3,68
<b>Áustria</b>	26790	2400	11,16
<b>Alemanha</b>	25166	5449	4,62
<b>Bulgária</b>	16067	11800	1,36
<b>Portugal</b>	<b>10528</b>	<b>6255</b>	<b>1,68</b>
<b>Hungria</b>	7744	1795	4,31
<b>Bélgica</b>	7000	1224	5,72
<b>Eslovénia</b>	2635	92	28,64
<b>República Checa</b>	2379	862	2,76
<b>Reino Unido</b>	1200	447	2,68
<b>Lituânia</b>	1129	1141	0,99
<b>Chipre</b>	501	162	3,09
<b>Holanda</b>	370	700	0,53
<b>Letónia</b>	258	224	1,15
<b>Dinamarca</b>	200	60	3,33
<b>Suécia</b>	150	160	0,94
<b>Eslováquia</b>	140	93	1,51
<b>Estónia</b>	98	341	0,29
<b>Luxemburgo</b>	33	120	0,28
<b>Finlândia</b>	0	0	-
<b>Irlanda</b>	0	0	-
<b>Malta</b>	0	0	-

Quadro A3 – Dados estatísticos da cultura da cerejeira em Portugal nos últimos dez anos.

<b>Cerejas em Portugal</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>
<b>Produção (t)</b>	7632	11981	19990	14135	16149	15612	15561	9389	10528	11227
<b>Área Cultivada (ha)</b>	5733	5801	5875	5960	6237	6277	6350	6267	6255	6258
<b>Produtividade (t/ha)</b>	1,33	2,07	3,40	2,37	2,59	2,49	2,45	1,50	1,68	1,79

(FAOSTAT)

Quadro A4 – Dados estatísticos sobre o peso da produção nacional e área cultivada da cultura da cereja no mundo e na UE (27) (FAOSTAT).

<b>Cerejas 2008</b>	<b>Produção (t)</b>	<b>Área Cultivada (ha)</b>
<b>Mundo</b>	1802231	350157
<b>UE (27)</b>	489753	125179
% da EU (27) no mundo	27,2%	35,7%
<b>Portugal</b>	10528	6255
<b>% no mundo</b>	0,6%	1,8%
<b>% na UE (27)</b>	2,1%	5,0%

Quadro A5 – Dados estatísticos da balança comercial portuguesa de 2000 a 2007 para a cultura da cereja (FAOSTAT).

<b>Cerejas</b>	<b>Importações</b>			<b>Exportações</b>		
	<b>ton</b>	<b>milhares de €</b>	<b>€/Kg</b>	<b>ton</b>	<b>milhares de €</b>	<b>€/Kg</b>
<b>2000</b>	1054	1373,9	1,30	32	29,6	0,93
<b>2001</b>	1070	1490,2	1,39	9	7,2	0,80
<b>2002</b>	1167	1854,8	1,59	10	24,5	2,45
<b>2003</b>	1498	3273,4	2,19	9	23,1	2,57
<b>2004</b>	1712	3609,1	2,11	5	19,5	3,90
<b>2005</b>	1472	2902,3	1,97	174	352,3	2,02
<b>2006</b>	1898	3305,9	1,74	109	205,8	1,89
<b>2007</b>	1271	3601,2	2,83	31	128,5	4,15



## **Anexo II – Localização e caracterização dos oito clones da cultivar De Saco do Douro**

- Quatro clones na Quinta de Cantim na freguesia de São João de Fontoura, conselho de Resende:
    - C1: árvore com porte alto, seguramente com mais de 10 anos, árvore a cerca de 300 m de altitude, a meia encosta. Tinha a particularidade de apresentar muito poucas flores na altura da floração em comparação com as outras árvores, o que poderá ter interferências ao nível do vingamento do fruto pela baixa competitividade de fotoassimilados entre as flores. Árvore equilibrada e aparentemente de boa saúde. Esta árvore foi polinizada com pólen da cultivar De Saco do Douro (auto-polinização).
    - C2, C3 e C4: árvores ainda em desenvolvimento com cerca de 3 anos de idade, também a meia encosta, a cerca de 300 m de altitude. O número de flores era proporcional ao seu porte, ou seja, não havia muitas em valor absoluto, mas em termos relativos poder-se-ia considerar como tendo uma floração normal. Em algumas árvores apareceram insectos da espécie *Forficula auricularia*, mas nestas três árvores em particular, a abundância era mais elevada, tendo aparecido um exemplar destes em muitos sacos. Árvores equilibradas e aparentemente de boa saúde. A C2 foi polinizada com pólen da 'De Saco do Douro', a C3 e C4 foram polinizadas com pólen da 'Van'.
  - Um clone na Quinta de São João na freguesia de São João de Fontoura, conselho de Resende:
    - SJ: árvore com porte alto, seguramente com mais de 10 anos, árvore a cerca de 100 m de altitude, mais próxima do rio. Árvore com alguns dias de avanço em termos fenológicos em relação às restantes cerejeiras 'De Saco do Douro'. Situada num pomar de cerejeiras, mas um pouco isolada das restantes, tinha como árvores vizinhas mais próximas duas laranjeiras. Árvore com uma boa floração, equilibrada e aparentemente de boa saúde. Esta árvore foi polinizada com pólen da 'Burlat'.
  - Um clone na Quinta da Soenga na freguesia de São Martinho de Mouros, concelho de Resende:
    - S: árvore com porte alto, seguramente com mais de 10 anos, árvore a cerca de 300 m de altitude, a meia encosta. Árvore também um pouco isolada das restantes cerejeiras do pomar. Árvore com uma boa floração, equilibrada e aparentemente de boa saúde. Apresentava algumas formigas mas muito poucas. Esta árvore foi polinizada com pólen da 'Burlat'.
-

- Um clone na Quinta do Vale na freguesia de São Martinho de Mouros, concelho de Resende:

- V: árvore com porte alto, seguramente com mais de 10 anos, árvore a cerca de 300 m de altitude, a meia encosta. Árvore muito próxima de uma estrada nacional, mas em que os sacos ficaram posicionados do lado oposto ao da estrada. Com excepção desta árvore, em todas as outras os sacos foram colocados aleatoriamente um pouco por todo o copado das cerejeiras abrangendo ramos a várias alturas do solo e em várias direcções. Árvore com uma boa floração, equilibrada e aparentemente de boa saúde. Apresentava algumas formigas mas muito poucas. Esta árvore foi polinizada com pólen da 'Bing'.

- Um clone na Quinta de Vila Verde na freguesia de São Martinho de Mouros, concelho de Resende:

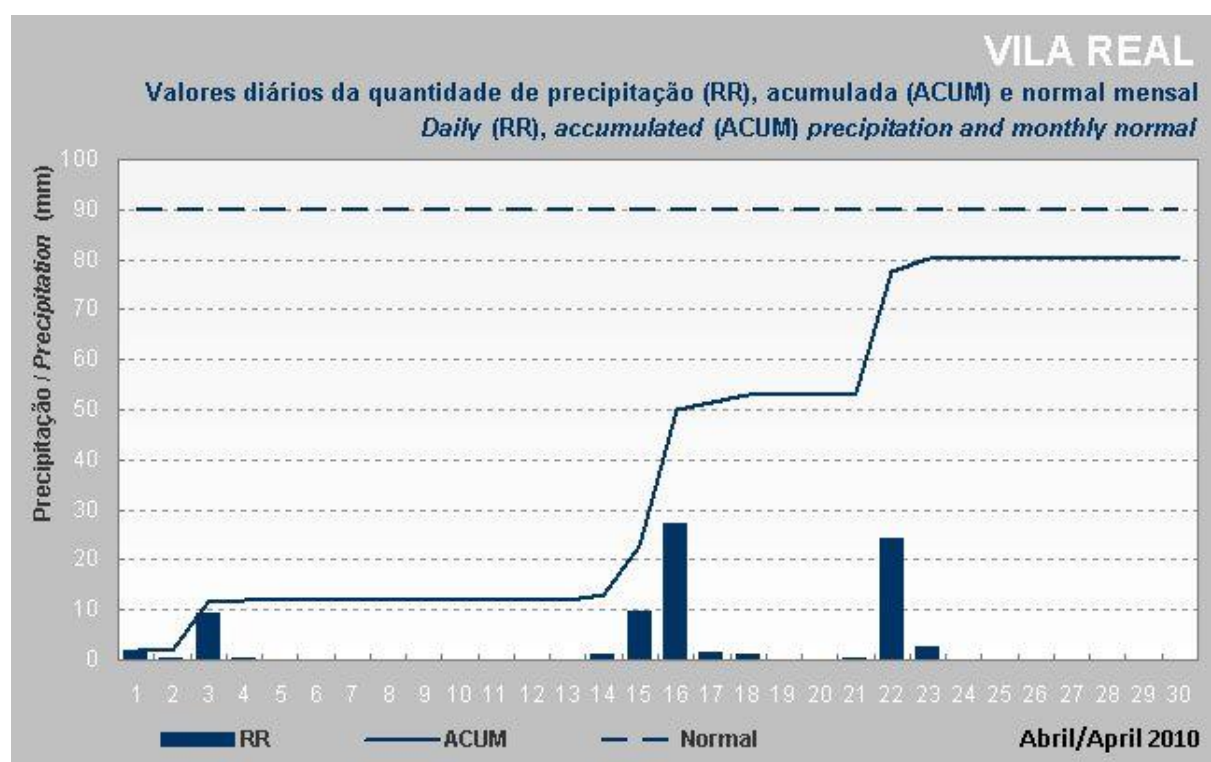
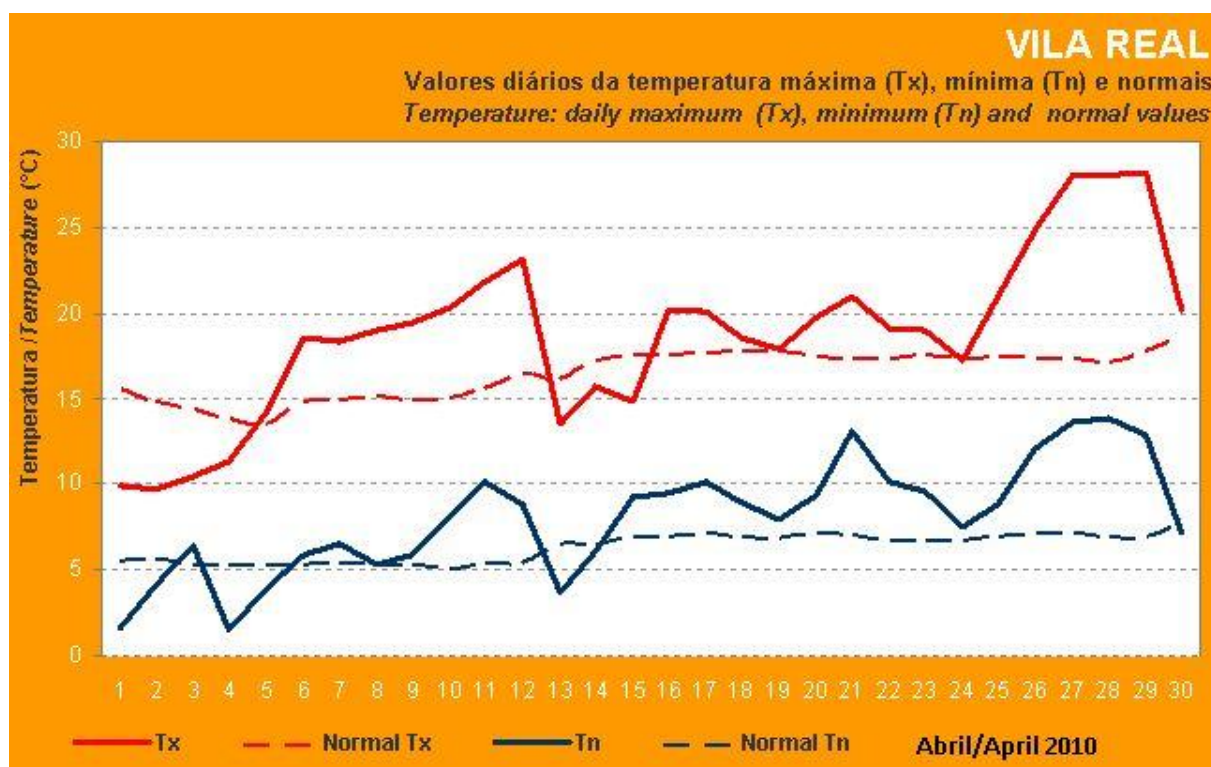
- VV: árvore com porte alto, seguramente com mais de 10 anos, árvore a cerca de 450 m de altitude. Árvore com dois ou três dias de atraso em termos fenológicos em relação às restantes árvores desta cultivar, provavelmente por estar a uma cota de altitude superior. Esta cerejeira estava isolada das restantes cerejeiras a cerca de 30 metros destas. Árvore com uma boa floração, equilibrada e aparentemente de boa saúde. Esta árvore foi polinizada com pólen da 'Bing'.

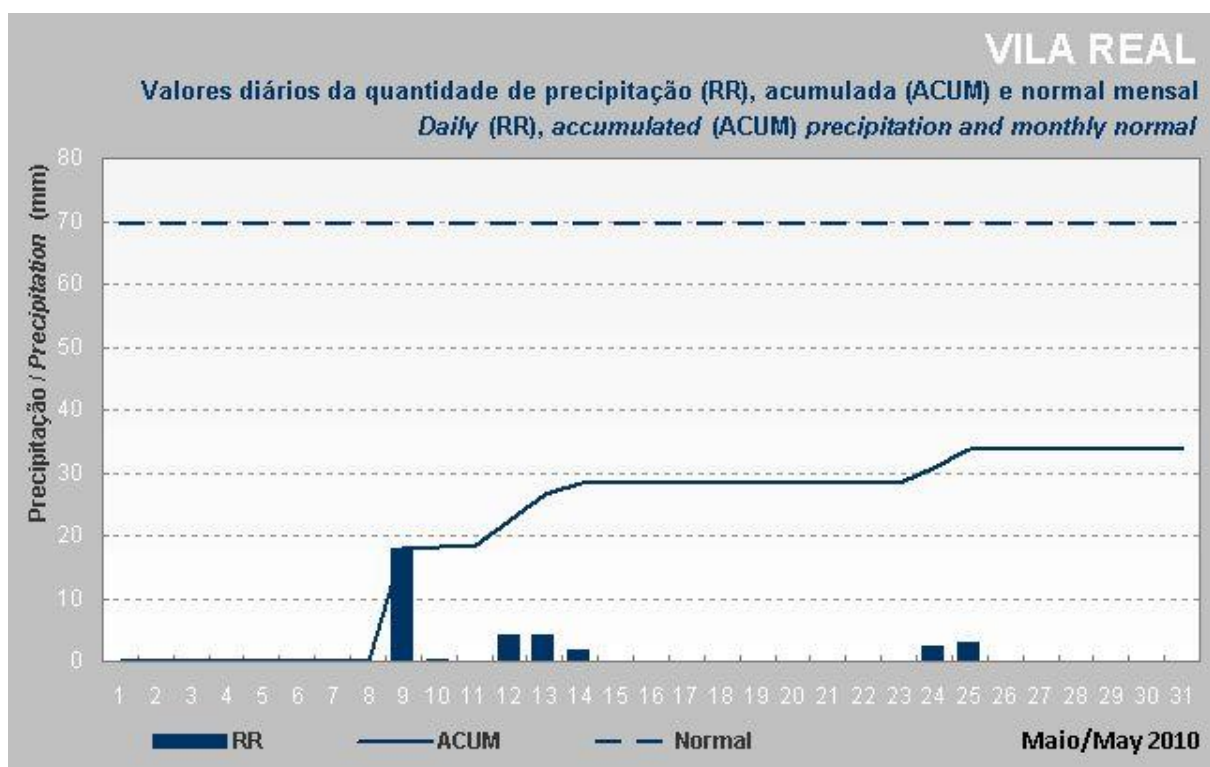
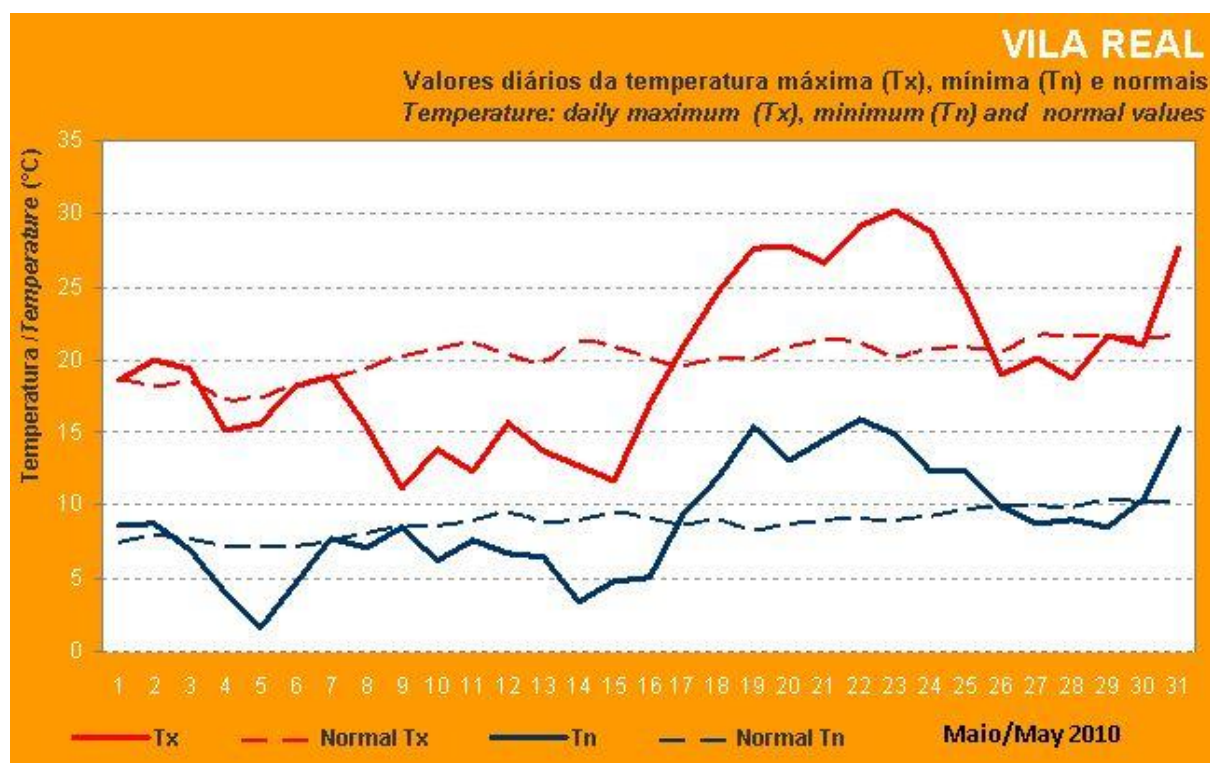
- É também nesta quinta que se encontram as três cultivares polinizadoras: 'Bing', 'Burlat' e 'Van'. Também estas árvores se encontram aparentemente de boa saúde, bem nutridas e equilibradas.

---

### Anexo III – Condições climáticas ocorridas no mês de Abril na região de Resende

Valores diários das temperaturas e precipitações ocorridas em Vila Real nos meses de Abril e Maio (Instituto de Meteorologia). As condições climáticas registadas pela estação meteorológica de Vila Real são consideradas as de referência para a região de Resende.





## **Anexo IV – Ensaio para a determinação do vingamento e avaliação da viabilidade do pólen**

### Primeiro dia de ensaio

- Num pomar de cerejeiras escolher e marcar as árvores da cultivar a polinizar, estas devem ser equilibradas e estar isentas de pragas e doenças. As árvores deverão estar quanto possível longe de caminhos de passagem, num local resguardado e longe da influência de qualquer factor externo que possa interferir com a polinização das flores e vingamento dos frutos.
  - Em cada árvore escolher e marcar os esporões com uma fita numerada. Os esporões devem estar uniformemente distribuídos pela árvore. Um dos esporões deverá ser o controlo, onde estarão as flores testemunha.
  - “Limpar” cada esporão de modo a que fique cerca de 5 - 6 flores no estado de balão, eliminando as flores que estão mais atrasadas (estado de gomo) e as que estão mais adiantadas (flor aberta).
  - Com uma pinça, retirar as pétalas das flores no estado de balão e emascular a flor retirando pela base os órgãos sexuais masculinos (os estames), impedindo assim que haja uma polinização da parte feminina com o pólen da própria flor (auto-polinização). Ter o cuidado de não partir nem danificar o estigma durante a emasculação. Emascular cerca de 50 flores por genótipo a polinizar.
  - Colocar de imediato o saco de algodão em cada esporão tendo o cuidado de deixar uma certa folga de modo a não fazer peso em cima da flor. Repetir este procedimento para todas as árvores, desinfetando as mãos antes do início de uma nova emasculação.
  - As flores testemunhas não são emasculadas nem cobertas pelo saco.
  - Os sacos ficam colocados até ao vingamento, até à queda das pétalas, cerca de 8 a 10 dias depois da polinização.
  - No mesmo dia em que se procede à emasculação recolher cerca as flores no estado de balão das árvores polinizadoras (50 flores por cada genótipo polinizador).
  - Retirar as pétalas e sépalas das flores e, com uma pinça, remover as anteras para uma placa de Petri de vidro. Marcar as placas e tapar as mesmas com uma folha de papel, permitindo que o pólen seque e se liberte das anteras, deixando-o a secar durante cerca de 48 horas a uma temperatura de 20 °C.
-

Quarto dia de ensaio

- Separar os grãos de pólen dos sacos polínicos e dos filetes, batendo levemente de lado na placa de Petri.
  - Com a ajuda de um pincel, verter o pólen de cada cultivar para dois tubos de vidro com tampa marcados. O pólen de um dos tubos será usado na polinização, o outro será utilizado para fazer os testes de viabilidade e de germinação.
  - Realizar a polinização antes das horas de maior calor: molhar o pincel no pólen, levantar ligeiramente o saco e aplicar o pólen no estigma de cada flor com uma só passagem. De seguida fechar novamente o saco, e anotar o número exacto de flores que foram polinizadas por cada esporão.
  - Lavar as mãos com álcool antes de iniciar o cruzamento com outra cultivar.
  - Após a polinização no campo, colocar metade da quantidade do pólen destinado aos testes de viabilidade e germinação numa estufa a 80°C durante cerca de 2 horas para esterilizar o pólen.
  - Para cada polinizadora, fazer uma suspensão com a outra metade do pólen fresco em 300 µl de água esterilizada em tubos de Eppendorf.
  - No vortex misturar a solução durante cerca de 2 minutos.
  - Na placa de germinação, preparada previamente com agar e 15 % de sacarose conforme está descrito no Anexo V, plaquear com cerca de 200 µl da suspensão, dispersar os grãos de pólen. Marcar a placa e selar a mesma com papel Parafilm®, embrulhar a placa em papel de alumínio e colocar na estufa a 25 °C durante 24 horas na posição invertida. Preparar uma placa por polinizadora.
  - Fazer os testes do IKI, TTC e X-Gal para o pólen viável das polinizadoras:
    - numa lâmina colocar 20 µl da suspensão de pólen.
    - juntar à suspensão de pólen cerca de 20 µl ou mais do reagente para cada teste. Colocar uma lamela em cada amostra, marcar a lâmina e deixar actuar dependendo de cada teste: - IKI: 2 minutos à temperatura ambiente
      - TTC: 2 horas à temperatura ambiente
      - X-Gal: 30 minutos a 37 °C no escuro
  - Contagem ao microscópio: contar 300 grãos de pólen para os testes de germinação e de viabilidade. Para cada teste contar os negativos e os positivos (não germinados / germinados e não corados / corados, dependendo do teste).
-

Quinto dia de ensaio

- Repetir polinização antes do calor, seguindo o mesmo procedimento utilizado no dia anterior.
  - Repetir testes de germinação e viabilidade.
  - Fazer os testes de viabilidade e germinação com o pólen estéril.
-

## **Anexo V – Preparação das soluções para os testes de viabilidade e do meio de germinação**

### Preparação das soluções para os testes de viabilidade:

#### - Solução de IKI:

- Pesar 1 g de iodeto de potássio para um frasco de vidro de 100 ml.
- Pesar 0,5 g de iodo para o mesmo frasco de vidro.
- Com uma proveta, medir 100 ml de água destilada e introduzir no frasco de vidro. Homogeneizar a solução dissolvendo o iodeto de potássio e o iodo.
- Revestir com papel de alumínio e colocar a solução no frigorífico.

#### - Solução de TTC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio) a 1 %:

- Pesar 0,5 g de TTC e colocar num frasco de vidro de 50 ml.
- Com uma proveta, medir 50 ml de água destilada e introduzir no frasco de vidro. Homogeneizar a solução e colocá-la no frigorífico.

#### - Solução de X-Gal: - 1 mg de X-Gal dissolvido em 50 µl N-dimetil formamida e 1 ml de um tampão de acetato (50 mmol, pH 4,8)

- Pipetar 20 µl de uma solução stock de X-Gal (50 mg X-Gal/ml N-dimetil formamida (DMF)) para um tubo de eppendorf.
- Pipetar 30 µl de DMF para o mesmo tubo eppendorf.
- Pipetar 1000 µl de um tampão de acetato (50 mmol, pH 4,8) e colocar no tubo eppendorf.
- Marcar o tubo e colocá-lo no frigorífico.

#### Preparação do tampão de acetato (50 mmol, pH 4,8):

- Pesar 2,07 g de acetato de sódio para um frasco de vidro de 500 ml.
- Medir 500 ml de água destilada com uma proveta e colocar no frasco de vidro.
- No interior da hote pipetar 810 µl de ácido acético glacial para o mesmo frasco de vidro.
- Verificar o pH com o potenciómetro.

### Preparação de 0,5 L de meio de germinação:

- 0,5 % agar + 15 % sacarose + 5 ppm ácido bórico

- Pesar 2,5 g de agar e introduzir num frasco de vidro 0,5 L.
  - Pesar 2,5 mg de ácido bórico para o mesmo frasco.
-



- Pesar 75 g de sacarose e com um agitador magnético dissolver num copo de precipitação com água destilada à temperatura ambiente.
  - Introduzir a solução de sacarose num balão volumétrico de 0,5 L e completar o volume com água destilada. Homogeneizar a solução e introduzir no frasco de vidro.
  - Esterilizar a solução no autoclave e depois de deixar arrefecer, distribuir o meio pelas placas de Petri numa bancada de fluxo laminar.
  - Deixar o meio solidificar e tapar as placas com a tampa, selando-as com papel Parafilm®. Marcar as placas e colocá-las no frigorífico na posição invertida.
-

## **Anexo VI – Protocolos envolvendo a manipulação de DNA**

- Extracção de DNA genómico total pelo método de Doyle & Doyle

- Preparação do tampão 2XCTAB para 500 ml:

- Pesar 10 g de CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) e colocar num frasco de 500 ml.
- Adicionar 140 ml de NaCl 5 M.
- Adicionar 20 ml de EDTA 0,5 M pH8.
- Adicionar 50 ml de Tris-HCl 1 M pH8.
- Pesar 5 g de PVP-40 para o frasco, e perfazer o volume de 500 ml com água destilada.

- Extracção:

1. Colocar num tubo marcado 10 ml de tampão 2X CTAB mais 1 % de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) por grama de folhas.
  2. Colocar o tubo em banho-maria a 65°C.
  3. Moer a amostra de folhas num almofariz previamente arrefecido com azoto líquido, macerando até a amostra ficar num pó fino.
  4. Após a evaporação completa do azoto, transferir o macerado com a ajuda de uma espátula para o tubo contendo a solução CTAB e agitar de imediato para a amostra não oxidar.
  5. Colocar novamente o tubo no banho-maria a 65 °C durante meia hora, e ir agitando periodicamente de 5 em 5 minutos.
  6. Retirar o tubo do banho-maria e deixar arrefecer à temperatura ambiente.
  7. Na hote adicionar igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (CI) 24:1 e agitar por inversão durante 10 minutos.
  8. Centrifugar durante 10 minutos à temperatura ambiente e a 13 000 rpm. Retirar o sobrenadante para um novo tubo marcado.
  9. Colocar 10  $\mu$ g de RNase por ml de sobrenadante.
  10. Pôr o tubo a incubar em banho-maria durante 30 minutos a 37 °C.
  11. Deixar arrefecer e repetir os pontos 7 e 8.
  12. Adicionar 1/10 de volume em acetato de sódio (3 M, pH 5,2) e homogeneizar a solução.
  13. Adicionar 0,7 volumes de isopropanol, inverter o tubo repetidas vezes com suavidade para a cadeia de DNA se ir formando.
  14. Colocar num tubo eppendorf 1 ml de solução de lavagem de etanol a 76 % com acetato de amónio (10 mM).
-

15. Recolher o DNA, transferindo-o para o tubo eppendorf. Lavar com agitação no rotor durante duas horas.
16. Centrifugar brevemente (30 segundos) para o *pellet* vir para o fundo do tubo, eliminar sobrenadante e secar ao ar livre, longe dos raios directos do sol.
17. Quando estiver seco dissolver em TE (tris-EDTA) cobrindo bem o *pellet*. A quantidade de TE depende da dimensão do *pellet*. Conservar o DNA a 4 °C.

- Quantificação do DNA e determinação do seu grau de pureza por espectrofotometria

1. Para cada amostra de DNA a ser analisada, fazer uma diluição e medir num espectrofotómetro as absorvâncias a 230, 260 e 280 nm.
2. Calcular os rácios  $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$ . A concentração do DNA é dada por:

$$[\text{DNA}]\mu\text{g/ml} = \text{factor de diluição} \times A_{280} \times 50$$

- PCR para a amplificação dos fragmentos que codificam as S-RNases

1. Fazer uma reacção da polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação dos fragmentos num volume total de 25 µl contendo 100-300 ng de DNA genómico, o tampão da Taq polimerase 1X, 2,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador *forward* e *reverse* do par de iniciadores (PaConsl, PaConslI, T7 & M13 ou Pru-T2 & SI-32), 0,5 U de Taq Polimerase e  $\text{dH}_2\text{O}$  a perfazer o volume. Efectuar a reacção de PCR num termociclador, programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de: 45 segundos a 94 °C, 1 minuto a 60 °C (PaConsl, PaConslI e T7 & M13) ou 1 minuto a 54 °C (Pru-T2 & SI-32), 2 minutos a 72 °C; a extensão final de 10 minutos a 72 °C.
2. Fazer uma electroforese num gel de 2 % de agarose em 1X TAE com os fragmentos amplificados, utilizando marcadores apropriados (até cerca de 1000 pb para o par de iniciadores PaConsl, e maior que 1000 pb para o par PaConslI).
3. Colocar o gel a corar no brometo de etídio (0,5 µg/ml) durante 20 minutos. Visualizar e analisar os fragmentos num transiluminador de UV.

- Clonagem dos fragmentos amplificados no vector pCR®II

1. Efectuar a reacção de ligação num volume total de 5 µl, contendo 0,5 µl de produto de PCR, 50 ng de vector pCR®II, 2,5 U T4 DNA ligase (Fermentas) e 1X de tampão de ligação. Colocar a reacção a incubar a 22 °C durante toda a noite.
  2. Inactivar a enzima por desnaturação a 65 °C durante 15 minutos.
-

- Transformação

1. Para cada transformação preparar duas placas de Petri com um meio de agar, LB e 50 µg/ml de canamicina. Na bancada de fluxo laminar adicionar 35 µl de X-Gal (50 µg/ml) e, com uma ansa esterilizada, espalhar uniformemente por toda a placa.
2. Retirar da arca de -80 °C os tubos de eppendorf que contêm 100 µl de bactérias competentes de *Escherichia coli* DH5α e colocar imediatamente os tubos no gelo, deixando as bactérias a descongelar em gelo aproximadamente 15 minutos.
3. Adicionar directamente os 5 µl da reacção de ligação às bactérias competentes, e sem retirar os tubos do gelo, misturar cuidadosamente a solução com a ponta da pipeta.
4. Deixar os tubos no gelo a incubar durante 30 minutos.
5. Fazer um choque térmico às bactérias competentes, imergindo os tubos num banho-maria a 42 °C durante exactamente 45 segundos.
6. Colocar os tubos novamente no gelo e adicionar de imediato 900 µl de SOC (2 % Triptona, 0,5 % extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub> e 20 mM glucose) a cada tubo. Colocar de seguida os tubos num banho-maria a 37 °C com agitação, durante exactamente 1 hora;
7. Centrifugar os tubos durante 30 segundos a 13 000 rpm.
8. Retirar 750 µl de sobrenadante, ficando apenas as bactérias com 250 µl de SOC.
9. Agitar bem o meio para ressuspender as bactérias, utilizando o vortex em baixas frequências se for necessário.
10. Na bancada de fluxo laminar colocar os 250 µl da suspensão de bactérias em cada duas placas (125 µl em cada placa). Espalhar muito bem com uma ansa de vidro esterilizada à chama.
11. Colocar as placas na estufa na posição invertida a 37 °C, a incubar durante toda a noite.
12. Selar as placas com papel Parafilm® e transferi-las para o frigorífico, onde ficam na posição invertida durante 2 a 3 horas, para evidenciar a coloração azul das colónias negativas.

- Escolha das colónias para a multiplicação e purificação do plasmídeo com *insert*

1. Preparar uma placa de Petri com agar+LB+canamicina e X-Gal, seguindo o procedimento anterior, para servir de placa mãe. Desenhar um quadriculado na parte inferior da placa.
  2. Preparar um PCR de 20 µl em tubos eppendorf de PCR, contendo: 1X tampão da Taq polimerase, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador (T7
-

SEQ - 5'CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG3' e M13-48rev - 5'AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA CAG GA3'), 0,5 U de Taq Polimerase e dH<sub>2</sub>O a perfazer o volume.

3. Na câmara de fluxo laminar, picar com a ponta de uma micropipeta as colónias brancas isoladas e bem desenvolvidas (bactérias contendo o vector com o *insert*), e picar numa das quadrículas da placa mãe. De seguida introduzir a ponta da micropipeta no tubo de PCR já preparado, mexendo levemente para libertar as bactérias.
4. Incubar a placa mãe a 37 °C na estufa durante 16 horas.
5. Dar início à reacção de PCR, colocando os tubos no termociclador, programado de forma análoga à anteriormente referida.
6. Fazer uma electroforese dos produtos de PCR num gel de 2 % de agarose em 1X TAE e visualizar o resultado da transformação das colónias, analisando os fragmentos amplificados, como anteriormente descrito.

- Preparação de DNA plasmídico em pequena escala das colónias positivas (Sambrook *et al.*, 1989)

1. Na bancada de fluxo laminar preparar os tubos para a cultura líquida de bactérias, colocando 1,5 ml de LB com canamicina 50 µg/ml (LB) em cada tubo.
  2. Com um palito esterilizado, picar as colónias positivas da placa mãe e introduzi-lo em cada tubo com o meio de cultura preparado no ponto anterior. Tapar os tubos e selar com Parafilm®, colocando-os de seguida no banho-maria a 37 °C com agitação de 200-220 rpm durante 18 horas;
  3. À chama da lamparina, transferir 1,5 ml de cultura bacteriana de cada tubo, para tubos de eppendorf. Centrifugar a 13 000 rpm, a 4 °C durante 2 minutos. Retirar o sobrenadante com a ajuda de uma micropipeta e deixar o pellet bacteriano a secar ao ar;
  4. Ressuspender o pellet bacteriano em 100 µl de Solução I (solução de ressuspensão: 50 mM glucose, 25 mM Tris Cl, 10 mM EDTA), através de agitação no vortex;
  5. Adicionar 200 µl de Solução II preparada de fresco (solução de lise: 0,2 N NaOH, 1 % SDS) a cada tubo de eppendorf e misturar invertendo repetidamente os tubos. Colocar os tubos em gelo durante 5 a 10 minutos;
  6. Adicionar 150 µl de Solução III (solução de neutralização: 60 ml Acetato de potássio 5 M, 11,5 ml Ácido acético, 28,5 ml dH<sub>2</sub>O) e misturar por inversão. Incubar os tubos em gelo durante 5 minutos;
  7. Centrifugar a 13 000 rpm a 4 °C, durante 10 minutos. Com uma pipeta, transferir o sobrenadante para um tubo de eppendorf novo.
-

8. Adicionar 10 µg de RNase por ml de sobrenadante (cerca de 4,5 µl por cada tubo) e colocar a incubar a 37 °C durante 30 minutos;
9. Adicionar 1 volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitar invertendo repetidamente os tubos durante 2 minutos. Centrifugar a 13 000 rpm a 4 °C, durante 10 minutos. Com uma pipeta, transferir o sobrenadante para um tubo de eppendorf novo.
10. Precipitar o DNA plasmídico adicionando 1000 µl de etanol 100 % (-20 °C). Colocar os tubos no congelador a -20 °C, durante cerca de duas horas para uma precipitação com maior rendimento.
11. Centrifugar a 13 000rpm a 4 °C, durante 30 minutos. Eliminar o sobrenadante, colocando os tubos numa posição invertida sobre papel absorvente para uma drenagem do fluido mais eficaz;
12. Lavar o pellet obtido, adicionando 100 µl de etanol 70 % (-20 °C) e colocando os tubos a agitar horizontalmente durante 15 minutos à temperatura ambiente. Centrifugar a 13000 rpm, a 4 °C durante 10 minutos.
13. Remover o sobrenadante com a ajuda de uma micropipeta e colocar o *pellet* a secar a 37 °C durante 10 minutos.
14. Dissolver o *pellet* em 20 ou 30 µl de dH<sub>2</sub>O dependendo do seu tamanho.

- Amplificação dos fragmentos clonados para sequenciação

1. Fazer um PCR num volume total de 100 µl, contendo: 1 – 2 µl DNA plasmídico (dependendo da concentração), o par de iniciadores T7 & M13 e todos os outros constituintes necessários à realização desta reacção de amplificação nas mesmas concentrações e condições anteriormente descritas.

- Purificação dos fragmentos de DNA amplificados, com QIAGEN PCR Purification Kit (QUIAGEN) para sequenciação

1. Adicionar 5 volumes de PB buffer (500 µl) ao produto de PCR e colocar a mistura na coluna QIAquick apropriada para a purificação. Centrifugar a 13 000 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente. Eliminar do tubo o líquido drenado e voltar a colocar a coluna QIAquick no mesmo tubo.
  2. Adicionar à coluna 750 µl de PE Buffer. Centrifugar a 13 000 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente. Eliminar do tubo o líquido drenado e voltar a colocar a coluna QIAquick no mesmo tubo. Centrifugar uma segunda vez também a 13 000 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente, e mais uma vez eliminar o líquido drenado.
  3. Colocar a coluna QIAquick num novo tubo de eppendorf.
-

4. Adicionar 30 µl de dH<sub>2</sub>O bem no centro da membrana da coluna QIAquick. Esperar um minuto e centrifugar uma última vez a 13 000 rpm durante 1 minuto à temperatura ambiente. O líquido drenado foi recolhido e colocado num novo tubo eppendorf devidamente identificado.
5. Analisar o DNA quanto ao seu peso molecular e concentração, através da visualização dos fragmentos em gel de 2 % de agarose e 1X TAE, como realizado anteriormente.

- Digestão enzimática com as enzimas de restrição Mbol e SacI

1. A reacção de digestão enzimática foi realizada num tubo de eppendorf para um volume total de 12 µl, contendo: 10 µl de produto da reacção de PCR, 10X tampão da enzima (Mbol ou SacI) e 8 U de Mbol ou SacI.
  2. Agitar levemente os tubos contendo a reacção de digestão e centrifugar brevemente durante 30 segundos (*spin down*).
  3. Incubar os tubos a 37 °C durante 2 horas.
  4. Fazer uma electroforese dos produtos da digestão num gel de 2 % de agarose em 1X TAE durante uma hora a 120 V, e visualizar os fragmentos digeridos num transiluminador de UV depois de vinte minutos a corar em brometo de etídio.
-

## Anexo VII – Sequências nucleotídicas correspondentes aos alelos S dos genótipos sequenciados

```
ACTTGTTCTTGGTTTGGCTTCTCTTTTGTACGTTATGAGCAGCAGTGGTGGGTGCATTACAATCTTTTGCTCTTTAAATATCCTATAATC
AGCATTGGGTTTTTCTACTTGTGCTTTTGTTCATAGAAACAATTGTGTGCTGATGATAGATCACATGACATGTTGAATTCACCCACATATTT
TTCATTTAATCAAACGCACAACCTTTATATGGATGAGTAAGTATTCGGGGATTGCTTCGTGCATGTCTCTTTTGTATTCTGATAATTGTTG
CAATAAGTGCAGTCTATTTCATCACAATAATTTTCGCAGGATCTTACGACTATTTTCAATTGTTGCAACAATGGCCGCCGACCAACTGCAGAGCT
CGAAAGAGACCTTGCTCTAAACCCCGGCCATTACAAAACCTTCACCATCCATGGCCTATGGCCAAGTAATTATTCAAACCCCAACGATGCCAGTA
ATTGCATGGGTGCGCAATTTAAGCAGTAAAGTGGTATGATTGTTTCATTATTTTTTCACTTACTCTTTAGCATTATAGTTTTTTAGGAAGA
AATTTGAAATTTGTTTTTTTCAATAAATGTTGGGTGCTACATAAAATTTTCATTGGTCTCTGTTGGGCATATTATTTTGATTATATACCGAA
GGTATAAATTTGTTAATACATTTACATTGTATCAATGTAATAATGGATCTGCTCATCTAATTGAAGGACCTGCGTATATTCAAAATATTGTAC
ATAATGAAAGGTTTAAACCAAAACGCAGTTTAACTACAGGTTTAGTGAAGAAAAACAATCTTGTTCAAAATGAAAATTTGAAGTACCCC
TAAATTTGTTTCTGTTTTATCAAAATATGTATATATTGTTGGATGCTCAGTACCCCTAAATTGCGATCCAACTGAAGAGATCTTGGCCGGAC
GTGGAAGTGGCAATGATACAAAGTTTGGGAAGGCGAATGGAACAAACATGGTAAATGTCCGAACGGACACTTAACCAATTCATACTTCG
AGCGATCCACGAAATGTGGAATTTTCACAATATTACAGAGATCCTTAAACGCTTCAATCGTACCACATCCGACACAAACATGGAGCTACGC
GGATATAGTAGACCCATTAAAGCAGCAACTAAAGAACACCCCTCCTTCGTTGCAGACAGGACAAGAATACTGAGTTGTTACATGAAGTGGTA
CTTGTTATG
```

Figura 1 – Sequência nucleotídica do alelo S<sub>9</sub> da cultivar De Saco do Douro com 1232 bp, que foi amplificada com o par de iniciadores PaConsI-F & PaConsII-R (nas extremidades da sequência). Estão também realçados os **intrões** e os **exões** bem como os restantes iniciadores PaConsI-R e o PaConsII-F.

```
ACTTGTTCTTGGTTTGGCTTCTCTTTTGTATGTTATGAGCAGTGGTGGGTGCATTACAATCTTTTCTCTTTATATCCTATAAATGTGCA
TATAATCAGCATTGCGTTTTTCTGCTTTTATATTTGTTTATAGAACTATTGTGTGTGTAGATGATATATCAAACGACATGCGGTGTATT
GAATTCACCCACATATTTTGCATTAACTAAGCAGCAACTTTCTTGGATGAGTAAGTATTTTGGTGATGTTTTTCTGCATGTCTCTTTTT
ATTTTCATAATCTTTGTTTATTCTGGTAATTGTTGCAATAAGCGCAGTCTATTTCATCACAATAATTTTGGCAGGATCTTATGACTATTTTCA
ATTTGTGCAACAATAGCCACGCCCACTGCAGAGTTTCAACGAAATGCTCCAACCCCGGCCATTACAATATTTACCATCCATG
```

Figura 2 – Sequência nucleotídica parcial do alelo S<sub>5</sub> da cultivar De Saco da Cova da Beira com 462 bp, que foi amplificada com o par de iniciadores PaConsI-F & PaConsI-R. Estão também realçados o **intrão** e os **exões**.

```
ACTTGTTCTTGGTTTGGCTTCTCTTTTGTGTTTCATTATCAGCGCTGGTGATGGTGGGTGCCTTACAATCTTTTGCTCTATATATCCTATATG
CATATAATCAGCATTGCGTTTTTCTACTTGTATTTTTTGTTCAGAGAACTATATTGTGTGTGTGCAATAAGTGCAGTCTATTTCATCACAATA
ATTTTCGAGGATCTTACGCTATTTTCAATTGTGCAACAATGGCCACCGACCCTGCAGAGTTTCAAGAAATGCTCCAACCCCGGCCATT
TACAATACTTCACCATCCATG
```

Figura 3 – Sequência nucleotídica parcial do alelo S<sub>3</sub> da cultivar De Saco da Cova da Beira com 303 bp, que foi amplificada com o par de iniciadores PaConsI-F & PaConsI-R. Estão também realçados o **intrão** e os **exões**.

```
GGCCAAGTAATTATTCAAACCAACGATGCCAGTAATTGCAATGGGTGCGATTTAAGAAAGAGCTATTGGTAGGTATTGTTCTTTTGTGTTT
GTTTTGTTTTTTTTTCTCATTACCTTAAGCATTAGTTTTTAGGAAATTAGTTTGTACCTGAAGATAAATATGCTTTTTTTCAATAAAC
CTTGCGAGTTGGATAAAATTTGATGTTAGTTATGTGATTAGGCACATTATTTTGATTGTATACATAAGGACAGAATACAAATGAGCAATGCTA
GGCATAATCAGATTACAAATGTAGTATGACTAGCATTTTTTTATACAAATATATGTATATTAGTAGATATATTAAATGTACATAAATTTCAACCAT
CATATAAGATGGTATAAAATTTGGTAAAAATAGCAGTGGTACCTAATAAAATGGTAAAAATTAATTAATCAATTTAATAATCAGGTTATAAATG
AGAAAAGATGAAAATCTTCGCTAACGTTTTGACTTTTTTTTCTCTCAAAATATGGCTATATTGCGTGGATGTCCAGTCCCCTCGAATGCAAT
CCAACTGAAGATATCTTGGCCGAACGTTGTAAGTAGCAACGATACAAAATTTGGGAAAGTGAATGGAACAAACATGGTACTTGTTCGGAACA
GACACTTAACCAAGTGCATACTTCGAGATATCCACGAAATGTGGAACCTCGTTCAATATTACAGATATCCTTAAAAACGCTTCAATCGTACCA
CATCCGACACAAACATGGAGGTACTCGACATAGTATCAGCCATTGAGAGTAAACTCAAAGAACACCCCTCCTTCGTTGCAAAACGGATCCAG
CACATCCTAACGCGAATACTCAGTTGTTACATGAAGTGGTATTTGTTATG
```

Figura 4 – Sequência nucleotídica parcial do alelo S<sub>3</sub> da cultivar De Saco da Cova da Beira com 897 bp, que foi amplificada com o par de iniciadores PaConsII-F & PaConsII-R. Estão também realçados o **intrão** e os **exões**.



```

GGCCAAGTAATTATTCAAACCAACGAAGCCCAGTAATTGCAAGGGGTCGCAATTAACTTTACGAAAGTGGTATGCATTGTTTCGGTTTTTTA
TTTTATATTTTTATTATAATTATTATTATTTAAGACTCACTCATTAGCATTTAGTTTTTCAGAAAATTAGATTGTCACATGAAGGTCATAATAC
TTTTTTCAATAAACCTTTGGGGGCTAGGCACACTATTTTGAGTATATACTGAGTACAAAATTGTAAGTGCATTATATATTCGTAGGTATACATT
ATACTTGAGTACAAAATTAATAATCAAAAGTCAAGGCACTACAAAAAAGTGGTAATAGTTACCATTATGTCAACCAAAATTTGGTGATTGTTCTG
GGGGTTACTAAAGGATTAGTCACATTTTGTACTTTTTTGGTGACTAAAAAGGTTTTAAGTCACTTTTTTGGTTTTTTTAGTGACTAAAGCTT
TTAGTAACCCCTACAACAGTCACCAAAATGTCAACCAATAATGGTAAGTGTGCCACTCTTTTTTGTAGTGAGATTAAATGATGAAAAAATTAC
TATCCAATAATGAAACTCTAATTATGCTTAAGTTTGTACCTTTTTTTTTCTTTCTGAAAATATGTATATTGCTTGGATGTCTCAGTCCCTC
AATTGCGATCTATACTGAAGACATCTTGGCCAGACGTGGAAAGTGGCAATGATACAAAGTTTTGGGAAGGCGAATGGAACAAACATGGTACATG
TTCCGAACAGACACTTAACCAATGCAATACTTTCAGCGATCCTTCGCAATGTGGAGATCGTACAATATTACAAATATCCTTAAAAACGCTTCA
ATCGTACCGAGTGCACACAAACATGGACCTACTCCGACATAGTATCACCATTAAAGCAATAACTCAAACAACACCCCTCCTTCGTTGCAAAAC
AGTATAAGAATACTATGTTGTTACATGAAGTGGTACTTTGTTATA

```

Figura 5 – Sequência nucleotídica parcial do alelo  $S_{19}$  de 985 bp, que foi amplificada com o par de iniciadores PaConsII-F & PaConsII-R. Estão também realçados o **intrão** e os **exões**.

```

ACTTGTCTTGGTTTCGCTTTCTTCTGTTACGTTTTGAGCAGTGGTGGGTTGCATTACAATCTTTGCACTATATATCCTATATGCATA
TATATAATCAGCATGACATGCGGCATTGCATATAATCGTCACTCGCTCTCCTTTGTTGTTGTGCGTTTTTCTACATGTATTTTTTGCTTAGAGAA
ACTATTGTGTGTGTTTCGATGATATATCACATGACATGCGGTGTATTGGATTACCCACATATTTTCATTGATCTAACGCACAACCTTTCTTTG
GATGAGTAAGTATTTGGGGATTGCTTTTCTGCATGTCTCTTCTATTTTTTTTTCTTCTGATAATTGTGCAATAAGTACAGCCTATTTCATCA
CTATAATTTTGGCAGGATCTTACGACTATCTTCAATTTGTGCAACAATGGCCACCGACCAACTGCAGAGTTCGCATCAAGCGACCTTGCTCCAA
TCCCCGGCCATTACAATACTTCACCATCCATG

```

Figura 6 – Sequência nucleotídica parcial do alelo  $S_{4PW}$  de 502 bp, que foi amplificada com o par de iniciadores PaConsI-F & PaConsI-R. Estão também realçados o **intrão** e os **exões**, calculados com base na estrutura dos outros alelos identificados.